

# Université Bordeaux Segalen

Année 2011

Thèse n° 1910

## THÈSE

pour le

### DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

**Mention : Sciences, Technologie, Santé**

**Option : Oenologie**

**Présentée et soutenue publiquement**

*Le 15 décembre 2011*

*Par Carole LAMBERT*

*Née le 18 octobre 1985 à Saint Jean d'Angély*

## **Étude du rôle des stilbènes dans les défenses de la vigne contre les maladies du bois**

### **Membres du Jury**

M. C. Bertsch, Professeur à l'Université de Haute-Alsace .....	Président
Mme. M. Adrian, Professeur à l'Université de Bourgogne .....	Rapporteur
Mme. F. Fontaine, Maître de conférences à l'Université de Reims .....	Rapporteur
Mme. S. Cluzet, Maître de conférences à l'Université Bordeaux 2 .....	Examineur
M. J.M. Mérillon, Professeur à l'Université de Bordeaux 2 .....	Directeur de thèse



# Remerciements

---

*Ce travail a été initié en 2008 au Groupe d'Etude des Substances Végétales à Activité Biologique. Je remercie ceux qui m'ont confié ce sujet et qui l'ont guidé : M. Jean-Michel Mérillon et Mme Stéphanie Cluzet. Je tiens, par ces quelques mots, à leur témoigner ma sincère reconnaissance pour leur disponibilité, leur investissement et leurs encouragements bienveillants.*

*Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres du jury pour leur collaboration à l'examen de ce travail et leur participation à la soutenance.*

*Mesdames Marielle Adrian de l'Université de Bourgogne et Florence Fontaine de l'Université de Reims ont accepté d'être rapporteurs et Monsieur Christophe Bertsch de l'Université de Haute-Alsace a présidé ce jury. L'intérêt que vous avez porté à ce travail a permis une discussion enrichissante. Trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance.*

*Ce travail n'aurait pu se faire sans les collaborations établies au cours de cette thèse. Je remercie, Agnès Destrac-Irvine, Jean-Pascal Goutouly, Isabelle Merlin et Eric Gomes de l'UMR EGFV ainsi que Marie-France Corio-Costet, Gwenaëlle Comont, et Sébastien Gambier de l'UMR SAVE. Agnès, Jean-Pascal, je vous remercie d'avoir relu le manuscrit.*

*Merci également aux membres du GESVAB qui se sont investis dans cette thèse : Tristan Richard, Pierre Waffo-Téguo, Jonathan Bisson et Yorgos Papastamoulis. Votre implication dans ce travail a été décisive. Jonathan, bonne chance pour la fin de ta thèse.*

*Je remercie particulièrement Gérard Fondeville et Antonio Palos-Pinto pour leur aide et leur bonne humeur .*

*Cette thèse est aussi le fruit du travail des étudiants qui ont effectué leur stage au GESVAB : Sabrina Dutrey, Vanessa Chadeffaud, Sylvia Lucas et Ian Li-Kim-Kiook. Merci pour votre implication et votre sympathie.*

*Merci à tous les membres actuels et anciens du GESVAB. Au-delà de l'expérience professionnelle, ces trois années ont été humainement riche. Cela aura été un vrai plaisir de partager la vie quotidienne avec vous. J'espère retrouver cette ambiance de travail dans le futur.*

*Je fais un clin d'œil particulier à Merian Nassra. Nous avons commencé ce dur labeur ensemble et partagé des moments de complicité : ta sagesse aura éclairé nos conversations. Je te souhaite bonne chance pour la fin de ta thèse et pour la suite.*

*Merci à Nadège Telef-Micouleau et Stéphanie Krisa pour m'avoir initiée respectivement à la zumba et au théâtre et pour les échanges sympathiques qui ont jalonné ces trois ans.*

*Je remercie les membres du laboratoire de Biochimie du Raisin de la Faculté d'Œnologie de Bordeaux qui en premier m'ont formée à la recherche : Laurence Gény pour m'avoir accueillie dans le laboratoire et Annie l'Hyvernay pour m'avoir appris à « manipuler ». Je remercie tout particulièrement Séverine Gagné et Soizic Lacampagne. Soizic, Séverine, merci infiniment pour votre soutien et votre amitié. Vous êtes des exemples pour moi et j'espère que l'avenir vous sourira à la mesure de vos talents de chercheur !*

*Je salue également tous les membres de l'ISVV que j'ai côtoyé pendant mes années d'étude.*

*Je réserve mes derniers remerciements à mes proches.*

*A mes amis, Sabrina, Frodo et leur petit Axel, Rémi, Marion, Laurent et Nathalie.*

*A mes parents qui m'ont permis de faire ces études dans des conditions idéales et m'ont toujours écoutée et soutenue. Un remerciement particulier à papa pour ta passion pour les cours de botanique.*

*A ma sœur, son mari et leur petit garçon pour avoir égayé ma thèse de moments de bonheur.*

*A mes grand-parents, mon oncle et ma tante pour les instants partagés (le scrabble, les blagues, l'appel de la forêt, les papotages...).*

*A mon Ludo, puisses-tu me supporter encore longtemps, merci pour notre vie à deux.*

# Sommaire

---

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : Étude bibliographique.....	5
I. La vigne, sensible aux maladies cryptogamiques .....	5
I.1. Les maladies du bois de la vigne .....	7
I.1.1. L'importance des maladies du bois en France .....	7
I.1.2. L'eutypiose.....	9
I.1.3. Le syndrome de l'esca.....	10
I.1.4. Le Black Dead Arm.....	16
I.1.5. Facteurs influençant l'expression des symptômes de maladie du bois .....	18
I.1.1. Méthodes de lutte .....	20
II. Mécanismes de défense de la vigne face aux champignons .....	22
II.1. Les défenses passives/constitutives .....	22
II.2. Les défenses actives.....	23
II.2.1. Les récepteurs.....	24
II.2.2. Les éliciteurs .....	25
II.3. La signalisation cellulaire .....	28
II.4. Les réponses de défense induites.....	29
II.4.1. La synthèse de protéines PR.....	29
II.4.2. La synthèse de phytoalexines .....	31
II.4.3. Le renforcement pariétal .....	31
II.4.4. La réponse hypersensible .....	32
II.5. La résistance systémique .....	33
II.5.1. La résistance systémique acquise .....	33
II.5.2. La résistance systémique induite.....	34
III. Les composés phénoliques de la vigne .....	34
III.1. La biosynthèse des composés phénoliques .....	35

III.2.	Les flavonoïdes .....	37
III.2.1.	Les anthocyanes.....	37
III.2.2.	Les flavanols et les tanins .....	38
III.2.3.	Les flavonols.....	39
III.3.	Les non flavonoïdes .....	40
III.3.1.	Les acides phénols .....	40
III.3.2.	Les stilbènes .....	41
III.4.	Les stilbènes, phytoalexines de la vigne .....	44
III.4.1.	Activité antifongique des stilbènes.....	44
III.4.2.	Induction des stilbènes et résistance .....	45
III.4.3.	Effet toxique des stilbènes : mode d'action.....	46
III.4.4.	Détoxification des stilbènes par les champignons .....	47
IV.	Mécanismes de défenses et maladies vasculaires : cas de la vigne .....	48
IV.1.	Les mécanismes de défense dans le bois .....	48
IV.1.1.	Le CODIT .....	48
IV.1.2.	Le modèle « zone de réaction » .....	50
IV.1.3.	Le modèle de la restriction micro-environnementale .....	50
IV.2.	Polyphénols et maladies vasculaires .....	50
IV.3.	Maladies du bois de la vigne et défenses .....	52
IV.3.1.	Formation de thylls et de gommages .....	52
IV.3.2.	Expression de gènes codant des protéines de défense .....	53
IV.3.3.	Accumulation de composés phénoliques, importance des stilbènes .....	53
	CHAPITRE 2 : Matériels et Méthodes .....	57
I.	Matériel végétal.....	57
I.1.	Boutures foliaires.....	57
I.2.	Sarments d'une parcelle « esca/BDA » .....	58
I.3.	Sarments de la collection INRA Villenave d'Ornon .....	58
II.	Matériel fongique.....	59
III.	Etude de l'inhibition de la croissance mycélienne par les polyphénols.....	61
III.1.	Tests comparatifs d'inhibition de la croissance mycélienne.....	61
III.2.	Synergie entre composés phénoliques .....	62
III.3.	Détection de polyphénol oxydases.....	62

III.4.	Suivi des teneurs en resvératrol dans le milieu .....	63
III.5.	Observation en microscopie électronique à balayage .....	63
IV.	Infection de boutures par <i>D. seriata</i> et <i>N. parvum</i> .....	64
V.	Identification et dosage des polyphénols .....	65
V.1.	Extraction des polyphénols, identification par LC-NMR et LC-MS.....	65
V.2.	Extraction des polyphénols, dosage.....	67
V.2.1.	Extraction et dosage des polyphénols des sarments.....	67
V.2.2.	Extraction et dosage des polyphénols des boutures inoculées par <i>D. seriata</i> et <i>N. parvum</i> 67	
VI.	Dosage de métabolites, suivi d'expression de gènes dans les feuilles de boutures foliaires élicitées.....	68
VI.1.	Préparation du filtrat de milieu de culture de <i>P. chlamydospora</i> .....	68
VI.2.	Elicitation.....	68
VI.3.	Dosage des stilbènes dans les feuilles.....	69
VI.4.	Suivi de l'expression de gènes .....	70
VI.4.1.	Extraction des ARN totaux .....	70
VI.4.2.	Élimination de l'ADN génomique.....	71
VI.4.3.	Quantification et vérification de l'intégrité des ARN .....	72
VI.4.4.	Synthèse des ADN complémentaires .....	72
VI.4.5.	Amplification par PCR en temps réel.....	73
VI.4.6.	Amorces utilisées .....	73
VI.4.7.	Construction de la gamme étalon .....	74
VI.4.8.	Expression des résultats par la méthode $\Delta\Delta Ct$ .....	75
VII.	Analyse statistique .....	75
CHAPITRE 3 : Caractérisation des stilbènes du bois de la vigne.....		77
I.	Caractérisation de polyphénols « constitutifs » des sarments de <i>V. vinifera</i> .....	78
I.1.	Caractérisation des polyphénols par LC-NMR .....	78
I.2.	Caractérisation des polyphénols par LC-MS .....	84
I.3.	Dosage des composés phénoliques identifiés .....	84
II.	Discussion .....	85
CHAPITRE 4 : Effet des polyphénols sur les agents de maladies du bois .....		89
I.	Effet de composés phénoliques de la vigne sur la croissance mycélienne .....	90

I.1.	Criblage des 24 composés phénoliques .....	93
I.2.	Détermination de synergie entre polyphénols .....	98
I.3.	Discussion.....	100
II.	Etude de la famille des Botryosphaeriaceae .....	104
II.1.	Sensibilité de différentes espèces aux polyphénols .....	104
II.2.	Étude de l'impact du ptérostilbène sur la morphologie de <i>D. seriata</i> .....	107
II.3.	Discussion.....	108
III.	Conclusion .....	109
CHAPITRE 5 : Réponses de défense de la vigne aux agents de maladies du bois.....		111
I.	Suivi de la synthèse des polyphénols inoculées par <i>D. seriata</i> et <i>N. parvum</i> .....	112
I.1.	Teneurs en polyphénols dans les boutures infectées par deux Botryosphaeriaceae	113
I.2.	Discussion.....	115
II.	Comparaison des réponses de défense chez trois cépages de sensibilité différente à l'esca	118
II.1.	Mise au point .....	119
II.2.	Comparaison de la production de stilbènes dans les feuilles des trois cépages élicités	120
II.3.	Comparaison de l'expression de gènes de défense dans les feuilles des trois cépages	122
II.3.1.	Suivi de l'expression de gènes de la voie des phénylpropanoïdes .....	122
II.3.2.	Suivi de l'expression de gènes codant des protéines PR.....	125
II.4.	Discussion.....	126
III.	Conclusion .....	130
CHAPITRE 6 : Polyphénols constitutifs des sarments et induits par l'esca .....		131
I.	Étude des polyphénols constitutifs de 15 cépages de <i>V. vinifera</i> .....	132
I.1.	Effet du cépage sur les teneurs en polyphénols des sarments .....	133
I.2.	Comparaison des teneurs en polyphénols dans les sarments en 2010 et en 2011. ..	138
I.3.	Discussion.....	139
II.	Étude des polyphénols dans les sarments de plantes atteintes par l'esca.....	142
II.1.	Étude des teneurs en polyphénols.....	142
II.2.	Discussion.....	145
III.	Conclusion .....	146

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES .....	149
Références bibliographiques .....	155
Publications et communications scientifiques.....	179



# Abréviations

---

**ACP** : Analyse en Composante Principale

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**ADNc** : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

**ANOVA** : ANalysis Of VAriance

**ANS** : Anthocyanidine Synthase

**ARN** : Acide Ribonucléique

**ARNm** : Acide Ribonucléique messenger

**Avr** : Avirulence

**BDA** : Black Dead Arm

**BTH** : BenzoTHiadiazole

**C4H** : Cinnamate 4-Hydroxylase

**CC** : Coiled Coil

**CHI** : Chalcone isomérase

**CHS** : Chalcone synthase

**CI50** : Concentration Inhibitrice de 50% de la croissance mycélienne ici.

**4CL** : 4-coumarate : coenzyme A ligase

**CODIT** : Compartmentalization of Wood Decay in Tree

**COSY** : COrrrelation SpectroscopY

**CTAB** : Bromure d'Hexadecyltriméthylammonium

**Cv** : Cultivar (cépage)

**DEPC** : Diéthylpyrocarbonate

**DFR** : Dihydroflavonol réductase

**DNase** : Désoxyribonucléase

**dNTP** : DesoxyriboNucléotide TriPhosphate

**EDTA** : Acide Ethylène Diamine-Tétraacétique

**EF1**: Elongation Factor 1

**ESI** : Electrospray

**F3'H** : NADPH-cytochrome P450-flavonoïde 3'5'-hydroxylase

**F3H** : flavanone 3- $\beta$ -hydroxylase

**GESVAB** : Groupe d'Etude des Substances Végétales à Activité Biologique

**HPLC**: High Performance Liquid Chromatography

**HR** : Hypersensitive response

**INRA** : Institut National de Recherche Agronomique

**ISR** : Induced Systemic Resistance

**IT** : Ion trap

**LAR** : leucoanthocyanidine réductase

**LC-MS** : Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

**LC-NMR** : Liquid Chromatography-Nuclear Magnetic Resonance

**LDOX** : leucoanthocyanidine dioxygénase

**LRR** : Leucin Rich Repeat

**LysM** : Lysin Motif

**MAMP** : Microbe-Associated Molecular Pattern

**MAPK** : Mitogen-Activated Protein Kinase

**MTBE** : Methyl *Tert*-Butyl Ether

**NBS** : Nucleotide Binding Site

**OIV** : Organisation Internationale de la Vigne et du Vin

**PAL** : phénylalanine ammonialyase

**PAMP** : Pathogen-Associated Molecular Pattern

**Pch** : *Phaeomoniella chlamydozpora*

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**PDA** : Potato Dextrose Agar

**PDB** : Potato Dextrose Broth

**PPO** : PolyPhénol Oxydase

**PR** : Pathogenesis-Related

**PRR** : Pattern Recognition Receptor

**PVPP** : PolyVinylPolyPyrrolidone

**ROMT** : resveratrol O-methyl transferase

**RT** : Reverse-Transcription

**SAR** : Systemic Acquired Resistance

**SPE** : Solid Phase Extraction

**STS** : stilbène synthase

**STS** : Stilbène Synthase

**TAE** : Tris-Acétate-EDTA

**TFA** : TriFluoroacétique Acide

**TIR** : Toll Interleukine Receptor

**UMR** : Unité Mixte de Recherche

**UV** : Ultra-Violet



# Liste des Figures

---

**Figure 1 :** Symptômes associés à l'eutypiose : nanification et rabougrissement des rameaux au niveau des organes aériens (A) et nécrose sectorielle au niveau du bois (B). Photographies INRA et IFV.

**Figure 2 :** Symptômes associés au syndrome de l'esca. A, symptômes foliaires sur Cabernet sauvignon ; B, symptômes foliaires sur Sauvignon ; C, forme apoplectique de l'esca sur Ugni blanc (photographies A, B, C, C. Lambert) ; D, coupe transversale d'un cep atteint de l'esca (Larignon *et al.*, 2009).

**Figure 3 :** Colonisation du cep par les agents de l'esca (à gauche en section transversale ; à droite, en section longitudinale. Trois espèces fongiques ont été recherchées : *Fomitiporia punctata* (Fp), *Phaeoconiella chlamydospora* (Pch) et *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal). Les pourcentages indiqués correspondent au nombre de fois où ces espèces ont été isolées dans chaque zone. BN, nécrose brune ; BRW, bois brun-rouge ; AP, moelle altérée; BS, ponctuations noires en section transversale correspondant aux stries noires en section longitudinale; DP, moelle dégradée; BL, bordure foncée entourant la zone dégradée ; DW, bois entièrement dégradé ou amadou. (d'après Mugnai *et al.* 1999)

**Figure 4 :** Symptômes foliaires du black dead arm sur Merlot. (Photographies C. Lambert)

**Figure 5 :** Voie de biosynthèse simplifiée des composés phénoliques (d'après Dixon 1995). ANR : anthocyanidine réductase ; ANS : anthocyanidine synthase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase ; 4CL : 4-coumarate : coenzyme A ligase ; CHS : chalcone synthase ; CHI : chalcone isomérase ; DFR : dihydroflavonol réductase ; F3'H : NADPH-cytochrome P450-flavonoïde 3'5'-hydroxylase ; F3H : flavanone 3-β-hydroxylase ; LAR : leucoanthocyanidine réductase ; LDOX : leucoanthocyanidine dioxygénase ; PAL : phénylalanine ammonialyase ; ROMT : resveratrol O-méthyl transferase STS : stilbène synthase.

**Figure 6 :** Structure des anthocyanosides de la vigne.

**Figure 7 :** Structure de trois flavan-3-ols de la vigne.

**Figure 8 :** Structure de deux flavonols de la vigne.

**Figure 9 :** Structure de sept acides phénols de la vigne.

**Figure 10 :** Structure de cinq stilbènes de la vigne.

**Figure 11 :** Schémas représentant la compartimentalisation des agents pathogènes, ou CODIT, chez les espèces ligneuses. 1 : obstruction des vaisseaux conducteurs ; 2 : dernières cellules à paroi épaisse du cerne de l'année n-1 ; 3 : rayons ligneux transversaux ; 4 : couche de cellules formées après l'infection par le cambium et susceptible de contenir des composés antimicrobiens tels que les polyphénols. (A , d'après Rioux 2004 ; B illustration de D.M. Carol Warner pour le Bulletin d'information n°419 du « United States Department of Agriculture Forest Service », 1979).

**Figure 12 :** Structure chimique des 24 composés phénoliques utilisés dans les essais comparatifs de croissance mycélienne.

**Figure 13 :** Photographies illustrant le protocole d'élicitation des boutures foliaires par le filtrat de *P. chlamydospora*. La tige de la feuille est plongée dans un tube contenant le filtrat de *P. chlamydospora* dilué.

**Figure 14 :** Présentation sous forme de cluster hiérarchique des pourcentages de croissance mycélienne des 6 champignons testés en présence de chaque polyphénol. Plus la coloration est rouge, plus la molécule induit la croissance. Plus la coloration est verte plus la molécule inhibe la croissance. Une coloration noire signifie qu'aucun effet de la molécule n'a été observé. Les cases grisées correspondent à des tests non réalisés.

**Figure 15 :** Photographie illustrant l'essai de détection de polyphénol oxydases. Les espèces suivantes ont été testées : *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pal*), *Phaeoconiella chlamydospora* (*Pch*), *Fomitiporia mediterranea* (*Fm*), *Eutypa lata* (*El*), *Diplodia seriata* Bo F99-1(*Ds*) et *Neofusicoccum parvum* Bp 0014 (*Np*).

**Figure 16 :** Quantification du resvératrol dans le milieu gélosé au cours du temps. Trois conditions sont testées : resvératrol 500  $\mu$ M, resvératrol 500  $\mu$ M en présence d'*E. lata* et resvératrol 500  $\mu$ M en présence de *F. mediterranea*. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes de trois répétitions chacune.

**Figure 17 :** Évaluation de la croissance mycélienne de *D. seriata* Bo F99-1 sur milieu gélosé supplémenté en resvératrol à 250  $\mu$ M ou en picéatannol à 250  $\mu$ M ou par un mélange des deux composés, chacun à 250  $\mu$ M. Les résultats sont ceux d'une des trois expériences indépendantes ayant abouti aux mêmes conclusions. Les résultats sont exprimés en pourcentage de croissance par rapport au contrôle (100%) et représentent la moyenne  $\pm$  écart-type de trois répétitions.

**Figure 18 :** Cluster hiérarchique basé sur le pourcentage de croissance des différentes espèces de la famille des Botryosphaeriaceae en présence de resvératrol, picéatannol, ptérostilbène,  $\epsilon$ -viniférine ou d'acide férulique à 500 $\mu$ M.

**Figure 19 :** Observation de l'effet du ptérostilbène sur le mycélium de *D. seriata*. Les images représentent le mycélium vu à l'œil nu après deux jours de croissance sur le milieu contrôle (A) ou le milieu supplémenté en ptérostilbène à 500  $\mu$ M (C) ou observé en microscopie électronique à balayage au niveau de la zone de croissance active du mycélium sur le milieu contrôle (B) ou le milieu supplémenté en ptérostilbène à 500  $\mu$ M (D).

**Figure 20 :** Photographies de la partie ligneuse, en coupe longitudinale, des boutures témoin (A), inoculées par *N. parvum* (B) et par *D. seriata* (C). Les flèches indiquent les sites d'inoculation, le contrôle ayant été simplement percé.

**Figure 21 :** Teneurs des composés phénoliques dans le bois sain de boutures non infectées et le bois nécrosé de boutures infectées par *N. parvum* Per 20 et *D. seriata* BoF98-1. Les valeurs représentent la moyenne des valeurs établies sur 10 boutures  $\pm$  écartype. \* indique les valeurs significativement différentes des boutures non inoculées (ANOVA de Kruskal-Wallis, risque d'erreur de 5%).

**Figure 22 :** Teneurs en stilbènes dans les feuilles de boutures, après 24h d'élicitation par le filtrat de milieu de culture de *P. chlamydospora* (Pch). Trois dilutions ont été testées : 1/100<sup>ème</sup>, 1/50<sup>ème</sup> et 1/10<sup>ème</sup>. Le contrôle (Czapek 1/10) correspond au milieu de culture Czapek Dox modifié dilué au 1/10<sup>ème</sup>. Les barres gris foncé correspondent au *trans*-picéide et les barres gris clair au *trans*-resvératrol. Les résultats représentent la moyenne de trois boutures foliaires ± écart type.

**Figure 23 :** Teneurs en *trans*-picéide, en *trans*-resvératrol et en  $\epsilon$ -viniférine dans les feuilles de Merlot, Cabernet-Sauvignon et de Carignan, élicitées par le filtrat de *P. chlamydospora*. Les valeurs exprimées en nmol/g de matière sèche de feuille correspondent à la moyenne ± écart-type de trois répétitions indépendantes de trois réplicats chacune.

**Figure 24 :** Évolution de l'expression de gènes codant une phénylalanine ammonialyase (*PAL*) et une stilbène synthase (*STS*) dans les feuilles de boutures de Merlot, Cabernet-Sauvignon et Carignan, au cours d'une élicitation de 24h par un filtrat de milieu de culture de *P. chlamydospora* dilué au 1/10.

**Figure 25 :** Comparaison de la production de *trans*-picéide (le stilbène majoritaire) et de l'expression du gène stilbène synthase (*STS*) dans les feuilles de boutures de Merlot, Cabernet-Sauvignon et Carignan, élicitées par un filtrat de milieu de culture *P. chlamydospora* pendant 24h.

**Figure 26 :** Évolution de l'expression de gènes codant une  $\beta$ -1,3-glucanase (*Glu*), une chitinase (*Chi4C*), une serine-protease inhibitor (*PIN*) et une protéine inhibitrice de polygalacturonase (*PGIP*) dans les feuilles de boutures de Merlot, Cabernet-Sauvignon et Carignan, au cours d'une élicitation de 24h par un filtrat de milieu de culture de *P. chlamydospora*.

**Figure 27 :** Projection des individus (les 15 cépages) sur les axes déterminés par l'ACP. Les cépages sensibles à l'esca sont entourés d'une ellipse grise.

**Figure 28 :** Projection des variables (les 15 cépages) sur les axes déterminés par l'ACP.

**Figure 29 :** Teneurs en polyphénols de sarments de Carignan, d'Ugni blanc, de Syrah, de Sauvignon, de Sémillon et de Cabernet-Sauvignon, prélevés en janvier 2010 (barres gris clairs) et janvier 2011 (barres gris foncé). Les résultats représentent la moyenne ± écart-type de dosages sur les sarments de 3 cepes.

**Figure 30 :** Teneurs en polyphénols dans les sarments d'un an et de deux ans de cepes de la zone de graves et d'argile ayant exprimé des symptômes d'esca chaque année ces 5 dernières années (exprimant) et n'ayant pas exprimé de symptômes depuis 5 ans (non exprimant). Les résultats représentent les moyennes des 10 à 20 cepes prélevés sur chaque zone et par condition d'expression ± écart-type. L'effet sol est plus marqué que l'effet « esca ».



# Liste des Tableaux

---

**Tableau I :** Sensibilité des cépages de *Vitis vinifera* à l'eutypiose (A) et à l'esca et au black dead arm (B). (Données issues de l'Observatoire national des maladies du bois, 2003-2008, l'incidence de la maladie est <2% pour les tolérants, de 2à 5% pour les sensibles et >5% pour les très sensible).

**Tableau II :** Liste non exhaustive des stilbènes identifiés dans les tiges et les sarments de *Vitis vinifera*.

**Tableau III :** Liste non exhaustive des stilbènes identifiés dans les feuilles et les baies de *Vitis vinifera*.

**Tableau IV :** Liste non exhaustive des composés phénoliques testés pour leur activité inhibitrice de la croissance mycélienne sur les champignons associés aux maladies du bois de la vigne. (Pal : *Phaeoacremonium aleophilum*, Pch : *Phaeoconiella chlamydospora*, Fp : *Fomitiporia punctata*, Sh : *Stereum hirsutum*, Pan : *Phaeoacremonium angustius*, Tmi : *Togninia minima* téléomorphe de *P. aleophilum*, Fm : *Fomitiporia mediterranea*, Lb : *Libertella blepharis* anamorphe de *E. lata*, El : *Eutypa lata*, Pi : *Phaeoacremonium inflatipes* ; 1 : Amborabé 2002, 2 : Bruno 2006c, 3 : Chapuis 1995, 4 : Coutos-Thévenot 2001, 5 : Del Rio 2004, 6 : Djoukeng 2009, 7 : Mazullo 2000, 8 : Mugnai 1999, 9 : Santos 2006).

**Tableau V :** Tableau précisant les informations de systématique, d'hôte et de pays d'origine des 14 souches de champignons utilisées dans notre étude.

**Tableau VI :** Gradient de solvant utilisé pour l'analyse des extraits de sarments en HPLC et LC-MS.

**Tableau VII :** Gradient utilisé pour l'analyse des stilbènes par HPLC fluorimétrie.

**Tableau VIII :** Nom et numéro d'accension des gènes suivis et séquences des amorces correspondantes utilisées en PCR quantitative.

**Tableau IX :** Données RMN <sup>1</sup>H de la (+)-catéchine dans l'acétonitrile *d*-3.

**Tableau X :** Données RMN <sup>1</sup>H de la (-)-épicatéchine dans l'acétonitrile *d*-3.

**Tableau XI :** Données RMN <sup>1</sup>H du *trans*-resvératrol dans l'acétonitrile *d*-3.

**Tableau XII :** Données RMN <sup>1</sup>H du *trans*-picéatannol dans l'acétonitrile *d*-3.

**Tableau XIII :** Données RMN <sup>1</sup>H de l' $\epsilon$ -viniférine dans l'acétonitrile *d*-3.

**Tableau XIV :** Données RMN <sup>1</sup>H de l'ampélopsine A dans l'acétonitrile *d*-3.

**Tableau XV :** Données RMN <sup>1</sup>H du (+)-hopéaphénol dans l'acétonitrile *d*-3.

**Tableau XVI** : Données RMN  $^1\text{H}$  du (-)-isohopéaphénol dans l'acétonitrile *d*-3.

**Tableau XVII** : Données RMN  $^1\text{H}$  de la vitisine B dans l'acétone.

**Tableau XVIII** : Principaux composés phénoliques identifiés dans les sarments de *V. vinifera* par le système HPLC-ESI-MS (trappe à ions). (Ces composés ont été identifiés par comparaison avec des standards).

**Tableau XIX** : Teneurs en polyphénols dans les sarments de Cabernet-Sauvignon.

**Tableau XX** : Comparaison des concentrations de nos molécules dans le milieu du test antifongique et des concentrations de ces molécules dans les **sarments de *V. vinifera*** lorsqu'elles sont connues. Les cases grisées correspondent aux molécules qui ont été testées à des concentrations plus fortes *in vitro* par rapport à celles *in planta*.

**Tableau XXI** : Pourcentage de croissance des différents agents de maladie du bois en présence des 24 composés phénoliques. Les chiffres dont la case est colorée représentent les valeurs significativement différentes du contrôle au seuil  $\alpha = 5\%$  (test de Mann Whitney). La coloration verte est utilisée pour une inhibition de la croissance mycélienne par rapport au contrôle, tandis que la coloration rouge indique une induction de la croissance mycélienne par rapport au contrôle. Les cases grises correspondent à des tests non réalisés. (*Ds*, *Diplodia seriata* BoF99-1 ; *Np*, *Neofusicoccum parvum* Bp0014 ; *El*, *Eutypa lata* ; *Fm*, *Fomitiporia mediterranea* ; *Pal*, *Phaeoacremonium aleophilum* ; *Pch*, *Phaeoconiella chlamydospora*)

**Tableau XXII** : CI50 de *Diplodia seriata* BoF99-1, *Neofusicoccum parvum* Bp0014 et *Eutypa lata* exprimée en  $\mu\text{M}$ . Les résultats représentent la moyenne de trois répétitions indépendantes.

**Tableau XXIII** : Effet de 5 composés phénoliques sur la croissance de 12 espèces fongiques de la famille des Botryosphaeriaceae. Les résultats sont présentés en pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du champignon en présence d'un composé phénolique par rapport par rapport à sa croissance sur le milieu contrôle (0% d'inhibition). *ns* signifie non significatif en accord avec les résultats du test de Mann Whitney au risque  $\alpha = 5\%$ .

**Tableau XXIV** : CI50 ( $\mu\text{M}$ ) du *trans*-resvératrol, *trans*-picéatannol, *trans*-ptérostilbène et de l' $\epsilon$ -viniférine sur la croissance mycélienne de 8 champignons de la famille des Botryosphaeriaceae. (-) signifie valeur non déterminée car la CI50 est supérieure à 500  $\mu\text{M}$ .

**Tableau XXV** : Comparaison des teneurs en stilbènes dans les boutures non inoculées et infectées par *N. parvum* Per20 et des concentrations de ces mêmes composés utilisés dans les tests d'inhibition de la croissance mycélienne mis en œuvre au chapitre 4. Les pourcentages d'inhibition obtenus avec les concentrations de l'essai antifongique sont rappelés.

**Tableau XXVI** : Teneurs en polyphénols dans les sarments de 15 cépages. La sensibilité des cépages aux maladies du bois est rappelée (T = tolérant incidence <2% vert foncé, S = sensible, 2-5% vert clair et TS= très sensible, >5% rose). Les valeurs, exprimées en  $\mu\text{g}$  par g de matière sèche, représentent la moyenne de dosages réalisés sur les sarments de 3 ceps  $\pm$  écarts-types. \* L'ampélopsine A et le miyabénol C sont exprimés en  $\mu\text{g}$  d'équivalent resvératrol. La couleur gris foncé met en avant les valeurs supérieures à 500  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS et les cases gris-clair, les valeurs supérieures à 200  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS.

**Tableau XXVII** : Effet du cépage sur la composition en polyphénols des sarments prélevés en 2011. L'analyse ANOVA de Kruskal-Wallis a permis de déterminer les valeurs H observées et les probabilités,  $p$ , associées. Les valeurs de  $p$  en rouge correspondent aux composés phénoliques dont les teneurs diffèrent significativement entre les cépages avec un risque d'erreur de 5%.



# INTRODUCTION

---

La vigne est une plante dont l'importance économique est de premier plan pour de nombreux pays, particulièrement en Europe, encore plus en France et à Bordeaux.

En une trentaine d'années, les maladies du bois, d'origine fongique, sont devenues une préoccupation majeure pour les viticulteurs. Non seulement elles sont à l'origine de pertes de rendement et de qualité mais surtout elles causent une mortalité importante. L'impact économique des maladies du bois est donc réel pour les viticulteurs, or il n'existe pas de solution curative à proprement parler.

L'eutypiose et le syndrome de l'esca sont deux exemples de maladies vasculaires de la vigne, majoritaires en France. Le caractère insidieux de ces maladies tient en trois points principaux : (i) l'internalisation des agents pathogènes, (ii) une phase de latence plus ou moins longue avant l'apparition des symptômes et (iii) une manifestation irrégulière de ces derniers en fonction des années. Si dans le cas de l'eutypiose un seul agent responsable de cette maladie, *Eutypa lata*, a été déterminé, il semble que dans le cas de l'esca, plusieurs agents entrent en jeu, compliquant un peu plus la compréhension de cette maladie.

Ces dernières années, les efforts fournis en matière de recherche sur les maladies du bois de la vigne ont été considérables : étude des agents pathogènes, des modes d'infection, des relations hôtes-parasites et des méthodes de lutte. Néanmoins les interrogations restent nombreuses. Si l'existence de cépages plus ou moins sensibles aux maladies du bois est un fait couramment observé, l'explication de ces différentes sensibilités n'a jamais réellement été apportée. Une des hypothèses qui pourrait être avancée, repose sur la présence en quantités plus élevées de composés antimicrobiens constitutifs et/ou induits dans les tissus ligneux des plantes tolérantes. Chez la vigne, de tels composés sont susceptibles d'appartenir à la famille des composés phénoliques.

Les composés phénoliques, dérivés de la voie des phénylpropanoïdes, sont connus pour leurs propriétés antifongiques contre les champignons pathogènes des organes herbacés, et leur implication dans la résistance de certains cultivars à ces mêmes parasites. En particulier, les stilbénoloïdes ont été mis en avant depuis les années 1970 comme phytoalexines de la vigne (i.e. molécules antimicrobiennes produites lors d'une attaque par un agent pathogène). Le rôle

des composés phénoliques dans la résistance des espèces ligneuses aux pourritures du bois a été étudié assez largement et leur possible implication dans la tolérance de la vigne aux maladies du bois est étayée par de récentes études. L'influence de certains composés sur la croissance des champignons impliqués dans les maladies du bois a notamment été démontrée. De plus, des composés phénoliques s'accumulent au niveau des zones nécrosées de ceps atteint d'esca, suggérant que ces composés puissent être défensifs. Néanmoins, peu de données sont disponibles sur les variations des teneurs en composés phénoliques entre différents cépages, l'influence de l'environnement sur ces composés et leur impact envers les différents agents pathogènes impliqués dans les maladies du bois.

L'objectif du travail présenté ici est d'approfondir les connaissances sur le rôle des polyphénols et en particulier celui des stilbènes dans la défense de la vigne contre les maladies du bois.

Pour répondre à cet objectif nous avons exploré plusieurs hypothèses :

- les stilbènes sont-ils les polyphénols aux propriétés antifongiques les plus marquées contre les agents de maladies du bois et lesquels sont les plus actifs ?
- les teneurs en polyphénols constitutifs (présents dans les tissus ligneux en l'absence de maladie) sont elles différentes en fonction des cépages, des facteurs environnementaux ? si oui, ces variations peuvent elles expliquer des différences de sensibilité aux maladies du bois ?
- quels sont les polyphénols dont la synthèse est induite chez les plantes infectées par les agents de maladie du bois ?
- les réponses de défense de différents cépages, suite à l'attaque d'un agent de maladie du bois, sont elles en relation avec leur niveau de sensibilité à celui-ci ?

La première partie de ce mémoire est une étude bibliographique concernant la vigne et ses agents pathogènes fongiques les mieux caractérisés, les maladies du bois, les mécanismes de défense de la vigne, les composés phénoliques et leur implication dans les maladies du bois. Cette étude est suivie d'un descriptif des matériels et méthodes utilisés au cours de ce travail.

La seconde partie présente les résultats obtenus. Tout d'abord, notre intérêt s'est porté sur l'activité antifongique des composés phénoliques de la vigne sur les différents agents de maladie du bois, en particulier de la famille des Botryosphaeriaceae.

Puis, une étude des teneurs en polyphénols constitutifs dans les sarments de différents cépages et la mise en relation de ces teneurs avec le niveau de sensibilité de ces cépages, sont présentées.

Par la suite, la réponse, suite à une élicitation par un filtrat d'un agent de l'esca, a été évaluée chez trois cépages de sensibilité différente aux maladies du bois. Cette réponse a été évaluée en terme de production de stilbènes et de suivi d'expression de gènes codant des enzymes de leur voie de biosynthèse mais aussi codant des protéines liées à la pathogenèse.

Enfin, l'influence du sol et des taux d'expression de la maladie sur les teneurs en polyphénols dans les sarments, a été recherchée en condition de plein champ.



# CHAPITRE 1 : Étude bibliographique

---

## I. La vigne, sensible aux maladies cryptogamiques

La vigne est une plante ligneuse, pérenne, de la famille des Vitacées. Les vignes cultivées appartiennent au genre *Vitis*, originaire de l'hémisphère nord : Amérique, Europe, Asie. Plus particulièrement les espèces d'intérêt agronomique dépendent du sous genre *Euvinifera*, au sein duquel les vignes sont distinguées en fonction de leur continent d'origine.

Le groupe européen ne comprend qu'une seule espèce *Vitis vinifera*, dans laquelle on distingue la vigne sauvage *Vitis sylvestris* de la vigne cultivée *Vitis sativa* dont découlent la plupart des cépages que nous connaissons (Merlot, Cabernet-Sauvignon, Ugni blanc, ...).

Les espèces américaines, une vingtaine au total, ont été introduites en Europe au début du 19ème siècle et avec elles, quelques parasites très dommageables : *Erysiphe necator*, agent de l'oïdium ; *Plasmopara viticola*, agent du mildiou ; *Guignardia bidwelli*, agent du black rot et *Dactylospora vitifoliae* agent du phylloxéra. C'est notamment à cause de ce dernier ravageur, que sont connues les espèces *Vitis rupestris*, *Vitis riparia* et *Vitis berlandieri* car elles ont permis d'obtenir des porte-greffes résistants, qui protègent encore aujourd'hui la vigne du phylloxéra.

Le cycle végétatif de la vigne se déroule sur un an selon différents stades phénologiques définis par (Baggiolini 1952) et (Eichhorn & Lorenz 1977). Après une période de dormance, les pleurs, qui correspondent à l'écoulement de sève brute à la surface des plaies de taille, correspondent à la reprise de l'activité de la vigne. Le débourrement, c'est-à-dire le développement des bourgeons formés l'année précédente, marquent le début de la croissance des rameaux et des futurs organes reproducteurs. Vers juin, du moins dans le bordelais, a lieu la floraison, rapidement suivie par la nouaison : le moment où les ovaires sont fécondés et commencent à grossir. Puis, vers le mois d'août, les baies de raisin changent de couleur, c'est la véraison qui est suivie de la phase de maturation du fruit dont la fin sera déterminée par la date de vendange, en général vers septembre. Les tiges herbacées stoppent leur croissance et prennent un aspect brunâtre, elles se lignifient et la plante accumule des réserves 'amidon,

sucré) au niveau du bois et des racines, c'est l'aoûtement. Il s'accompagne d'une accumulation de réserves dans les futurs bois et se poursuit jusqu'au mois de novembre qui marque le début d'une nouvelle période de repos végétatif. Les réserves ainsi accumulées permettront la reprise du cycle végétatif l'année suivante.

La culture de la vigne, pour l'obtention de raisin frais (30% de la consommation mondiale, source OIV), sec (7,4%) ou de moût de raisin et de vin (62,6%), est parmi les plus importantes au monde. Le vignoble mondial se répartit sur les cinq continents, mais 57,4% de la surface de vigne est concentrée en Europe, bien que cette superficie ait diminué de 9,2% entre 1995 et 2010, à la faveur des vignobles du nouveau monde (OIV 2010). La France est parmi les pays où la superficie du vignoble et la production, la consommation et l'export de vin sont les plus importants au monde.

Cette importance économique de la vigne explique sans doute en partie qu'elle soit la quatrième plante dont le génome a été séquencé (Jaillon *et al.* 2007; Velasco *et al.* 2007) après *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* (le riz) et *Populus trichocarpa* (le peuplier). Le séquençage a été réalisé sur un clone de Pinot noir, homozygote, PN40024 et a révélé l'existence de 30 434 gènes. Le transfert des connaissances acquises depuis les plantes modèles sur la vigne a notamment permis de prédire de nombreux gènes de résistance (Velasco *et al.* 2007).

L'impact économique de la vigne est fort. Sa protection phytosanitaire revêt des enjeux financiers importants mais également environnementaux depuis le Grenelle de l'environnement (2007) et le projet d'action Ecophyto 2018. En effet, la vigne est sensible à de nombreuses maladies dues à divers agents pathogènes : virus, phytoplasmes, bactéries, insectes et champignons. Néanmoins, la majorité des pesticides utilisés en viticulture sont des fongicides. En moyenne, 7 à 19 traitements sont appliqués par parcelle au cours d'une saison (Agreste). Les principales maladies visées par ces traitements sont le mildiou et l'oïdium et dans une moindre mesure la pourriture grise qui sont respectivement dues aux agents *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator* et *Botrytis cinerea*. Ces affections atteignent les organes herbacés de la vigne et peuvent être maîtrisées en conjuguant prophylaxie et usage des traitements chimiques.

Cependant depuis une vingtaine d'années, des maladies cryptogamiques touchant les vaisseaux conducteurs de sève de la vigne ont émergées.

## I.1. Les maladies du bois de la vigne

Les maladies vasculaires, aussi appelées maladies du flétrissement ou de dépérissement, correspondent à des atteintes du système des végétaux par des microorganismes (champignons, bactéries). Par exemple, le champignon *Verticillium dahliae*, responsable de la verticilliose, se développe dans le xylème de nombreuses espèces ; tomate, pomme de terre, pêcher, olivier, érable (etc.) ; entraînant un dessèchement et une nécrose prématurée des feuilles, voire de branches ou d'arbres entiers.

La vigne est sensible à plusieurs types de maladies vasculaires comme par exemple, la maladie d'Oléron, une nécrose bactérienne engendrée par *Xylophilus ampelinus*. Néanmoins, les maladies vasculaires les plus préoccupantes aujourd'hui sont celles dites « maladies du bois ». Elles sont dues à un ou plusieurs champignons capables de se développer dans les vaisseaux du xylème. La dégradation des tissus ligneux et la production de certains composés par les agents pathogènes, causent des perturbations dans le métabolisme de la plante et l'apparition de symptômes foliaires (Dubos 2002). La mort de la plante, à plus ou moins long terme, est inévitable.

Depuis la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, plusieurs syndromes ont pris de l'ampleur dans les vignobles des cinq continents : l'eutypiose, la maladie de Petri, le syndrome de l'esca, le Black foot et diverses infections du bois liées à des Botryosphaeriaceae. Les maladies vasculaires de la vigne sont alors devenues une préoccupation majeure. La recherche s'est intensifiée autour de cette thématique : la création de l' « International Council of Grapevine Trunk Diseases » qui réunit tous les deux ans les spécialistes du domaine, en est la preuve.

En France, les principales maladies du bois de la vigne sont l'eutypiose, l'esca et le Black Dead Arm (Larignon *et al.* 2009).

### I.1.1. L'importance des maladies du bois en France

La création d'un observatoire pluriannuel des maladies du bois, en 2002, a permis de faire un état des lieux en France. Entre 2003 et 2008 l'analyse a porté sur plus de 600 parcelles réparties dans la plupart des régions viticoles et représentant environ 27 cépages. Les données acquises portent sur l'expression de symptômes d'eutypiose et d'esca/BDA confondus, ainsi

que sur la mortalité des ceps et certains facteurs culturaux (âge de la parcelle, traitement à l'arsénite de sodium, système de taille,...).

Concernant l'eutypiose, le nombre de parcelles présentant au moins un cep exprimant la maladie évolue peu globalement, de 29,97% en 2003 à 35,78% en 2008 malgré de fortes augmentations en 2004, 2005 et 2007 (Observatoire National des Maladies du Bois, bilan de six années d'observation). Le pourcentage moyen de ceps atteints (incidence) par l'eutypiose diminue au cours des six années d'observations de 3,35% en 2003 à 2,54% en 2008. Cette incidence peut être bien plus élevée comme dans le cognaçais avec des valeurs supérieures à 20% entre 2003 et 2005.

Concernant l'esca et le BDA, la progression des maladies est bien plus marquée que dans le cas de l'eutypiose. Le nombre de parcelles exprimant des symptômes a augmenté au cours des six années d'études passant de 50,26% en 2003 à 72,96% en 2008. L'incidence de ces syndromes augmente aussi régulièrement : de 1,04% en 2003 à 3,23% en 2008. La plus forte incidence, 15%, a été enregistrée pour le cépage Trousseau dans le Jura en 2007.

Pour ces maladies, les chiffres avancés sont sous estimés du fait qu'une année sur l'autre, une même plante n'exprime pas forcément de symptômes. De plus globalement le pourcentage de ceps présentant des symptômes sévères augmente entre 2003 et 2008 : de 0,23 à 0,41% pour l'eutypiose et de 0,16 à 1,91% pour l'esca/BDA.

Les maladies du bois ont un impact économique qui est dû aux pertes de rendement et de qualité ainsi qu'à la mortalité. Les pertes de rendement sont la conséquence du dessèchement des inflorescences et des grappes ainsi qu'à l'affaiblissement, voire la mort de la plante. L'observatoire des maladies du bois a montré qu'entre 2003 et 2008 le nombre de ceps morts a presque doublé (0,89% à 1,53%) en corrélation avec l'augmentation de l'expression des symptômes de maladies du bois. Le nombre de ceps improductifs a doublé en six ans et atteint 11% en 2008.

La diminution de la qualité peut venir de la modification de la biosynthèse des arômes (Wicks & Davis 1999), des composés phénoliques (Afifi *et al.* 2003; Calzarano *et al.* 2004) et des sucres et acides (Calzarano *et al.* 2001; Calzarano *et al.* 2004). La qualité peut aussi être affectée par le rajeunissement des parcelles par complantation et le maintien d'une productivité avec un nombre moindre de ceps (Dubos 2002). Néanmoins il semble que la

qualité et le rendement d'un cep recépé ou malade mais n'exprimant pas de symptômes soient comparables à ceux d'un cep sain (Calzarano *et al.* 2004).

### I.1.2. L'eutypiose

L'eutypiose est due à un champignon ascomycète de la famille des diatrypacées : *Eutypa lata*. Sa forme asexuée (ou anamorphe) est *Libertella blepharis* et ne semble pas participer à la contamination de la plante.

L'agent responsable de l'eutypiose a d'abord été identifié en 1957, en Australie, sur l'abricotier sous le nom de *Eutypa armeniaca* Hansf. & M. V. Carter (Carter 1957). Ce n'est que dans les années 1970 que cet ascomycète est associé aux maladies vasculaires de la vigne (Carter & Price 1973) et que le postulat de Koch est vérifié (Moller & Kasimatis 1978).

Les symptômes de l'eutypiose peuvent apparaître 5 à 10 ans après l'infection par *E. lata* et leur expression est aléatoire (Wicks & Creaser 2001). Ils se caractérisent au printemps par des rameaux à l'aspect rabougri dont les entre-nœuds sont raccourcis et portant des feuilles petites déformées et nécrosées (Moller *et al.* 1974) (Figure 1a). Les inflorescences se dessèchent et s'il y a nouaison, une forte coulure ou des baies millerandées sont observées. Sur la partie externe du tronc, sous l'écorce, apparaissent des zones bosselées correspondant aux périthèces contenant les spores. Dans le bois, une nécrose sectorielle brune et dure apparaît au niveau d'une blessure (plaie de taille, accident mécanique) et se prolonge dans le bois (Figure 1b). Elle correspond à la zone de développement du champignon qui progresse grâce à des enzymes de dégradation : cellulases, xylanases,  $\beta$ -1,3- et  $\beta$ -1,4 -glucanases, chitinases, protéases (Larignon 1991; Schmidt *et al.* 1999).

La contamination au vignoble se fait par les périthèces présents sous l'écorce (Moller & Kasimatis 1978). La pluie favorise la libération des ascospores qui sont disséminés par le vent et se déposent sur les plaies de taille ou les blessures. La dissémination aérienne a lieu tout au long de l'année (Paillassa *et al.* 1992), néanmoins la contamination des plaies de taille au moment des pluies hivernales est la voie d'infection majeure. Les spores germent au niveau du xylème puis progressent lentement dans le bois. La reproduction d'*E. lata* se fait par voie sexuée : la diversité génétique des souches au vignoble est forte en Europe (Péros & Berger 1999, Travadon *et al.* 2011).



**Figure 1** : Symptômes associés à l'eutypiose : nanification et rabougrissement des rameaux au niveau des organes aériens (A) et nécrose sectorielle au niveau du bois (B). Photographies INRA et IFV.

*Eutypa lata* n'a été isolé que dans les bras et le tronc de la vigne (Bernard & Mur 1986). L'apparition des symptômes au niveau des organes herbacés est expliquée par la synthèse de toxines fongiques qui sont transportées par le xylème. La première toxine identifiée est l'eutypine (hydroxy-4 (methyl-3butène-3 ynyl -1)-3 benzaldéhyde) (Renaud *et al.* 1989). Grâce à son caractère acide et lipophile elle peut se fixer à la membrane, la traverser et s'accumuler dans la cellule où elle affecte le fonctionnement des mitochondries (Deswarte *et al.* 1996; Amborabé *et al.* 2001). L'eutypine peut être réduite par une aldéhyde-réductase NADPH-dépendante en eutypinol non toxique dans les tissus de la vigne (Colrat *et al.* 1999; Legrand *et al.* 2003). Il serait intéressant de vérifier si l'aptitude de différents cépages de *V. vinifera* à détoxifier l'eutypine est corrélée à leur sensibilité à *E. lata*. D'autres toxines ont été découvertes chez *E. lata* : phénols acétyléniques (Molyneux *et al.* 2002) et polypeptides (Octave *et al.* 2006; Octave *et al.* 2009).

### **I.1.3. Le syndrome de l'esca**

Cette maladie serait très ancienne dans le vignoble européen. Le terme esca est donné en 1922 par Pierre Viala et désigne une maladie associant une pourriture blanche, ou amadou et l'apoplexie. Une forme lente de la maladie est décrite au cours des années suivantes.

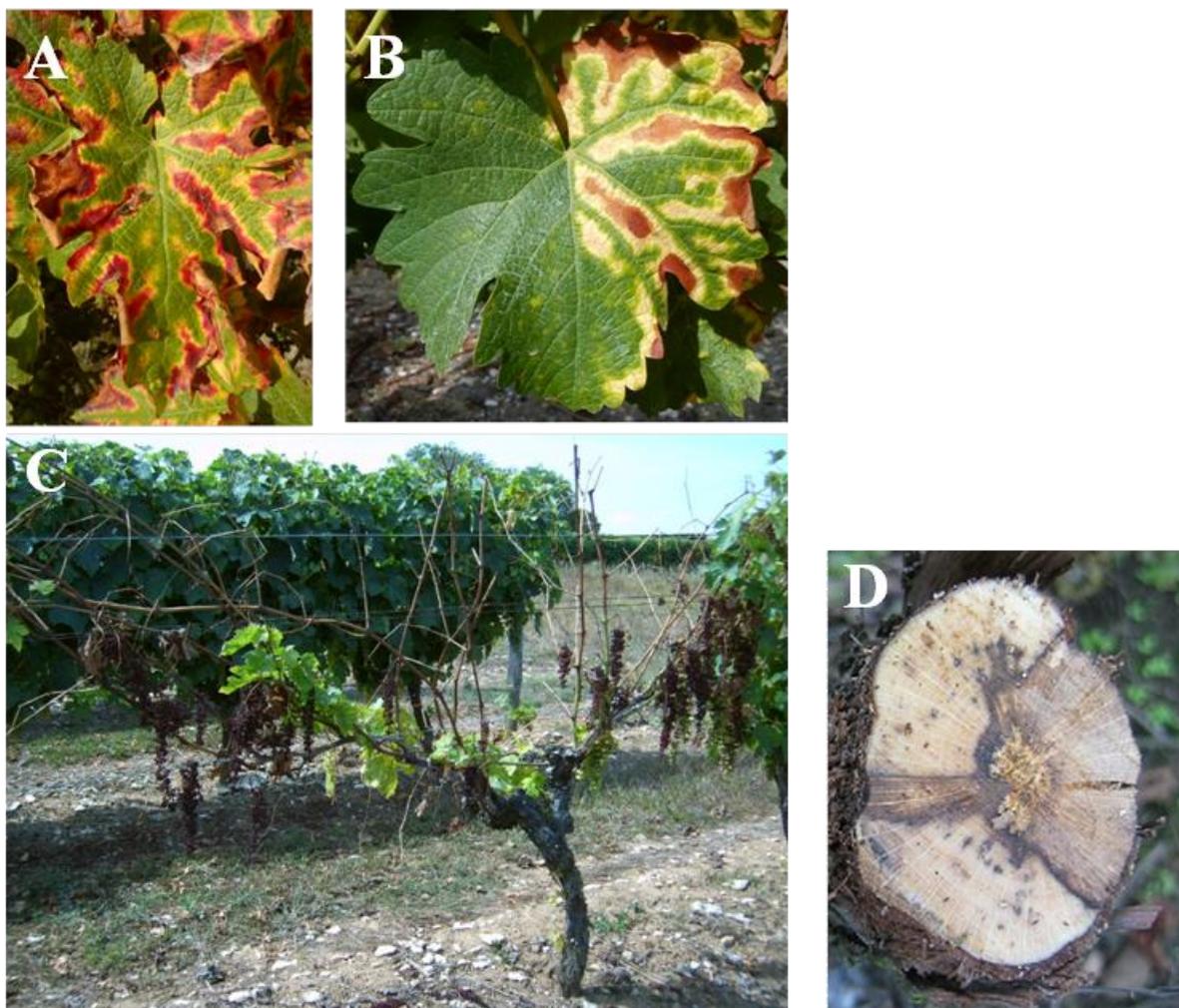
Les différents symptômes associés au syndrome de l'esca sont présentés Figure 2. Au niveau du tronc, les symptômes sont caractérisés par une zone centrale brune et dure (pré-nécrose) qui évolue en zone claire et molle (l'amadou), elle-même entourée d'une zone brune. Des punctuations noires peuvent aussi apparaître. Les symptômes foliaires permettent de distinguer la forme lente de la forme apoplectique. Dans le premier cas, des digitations internervaires jaunes sur les cépages blancs, jaunes et rouges sur les cépages noirs, apparaissent durant la période estivale et évoluent en nécrose pouvant aller jusqu'au dessèchement de la tige. La forme sévère correspond à un dessèchement total et soudain des organes aériens. Ces symptômes peuvent n'apparaître que sur un bras et à des degrés différents sur les sarments d'un même bras. Le dessèchement est dû à un déficit de transport de l'eau. Le dysfonctionnement du xylème serait lié d'une part à la dégradation du bois par les champignons et d'autre part à l'obstruction des vaisseaux par des structures défensives, les thylles et les gommés, qui permettent de confiner le mycélium aux vaisseaux infectés (del Río *et al.* 2004; Edwards *et al.* 2007). L'esca est également associé à une altération de la photosynthèse détectable 2 mois avant l'apparition des symptômes foliaires (Christen *et al.* 2007; Letousey *et al.* 2010) et à une mauvaise lignification des sarments (Andreini *et al.* 2010).

#### **I.1.3.1. Les agents pathogènes**

L'esca met en jeu un complexe fongique de plusieurs agents pathogènes dont les principaux sont : *Fomitiporia mediterranea* (Fischer & Kassemeyer 2003), *Phaeomoniella chlamydospora* (Crous & Gams 2000) et *Phaeoacremonium aleophilum* (Crous *et al.* 1996). D'autres champignons ont été associés à l'esca : *Cephalosporium* spp. (Chiarappa 1959), *Eutypa lata*, *Stereum hirsutum* et ainsi que plusieurs Botryosphaeriaceae dont *Diplodia seriata*.

*P. chlamydospora* P.W. Crous & W. Gams, est un ascomycète de la famille des Herpotrichiellaceae, aussi responsable de la maladie de Petri (Crous & Gams 2000).

Les pycnides, localisées au niveau de vieilles plaies de taille ou sous l'écorce, libèrent les pycnidiospores par dissémination aérienne. Les spores se développent sur les plaies de taille durant les périodes douces et pluvieuses de l'hiver ou, moins souvent, au niveau des plaies créées par les travaux en vert au cours de la phase végétative.



**Figure 2 :** Symptômes associés au syndrome de l'esca. A, symptômes foliaires sur Cabernet sauvignon ; B, symptômes foliaires sur Sauvignon ; C, forme apoplectique de l'esca sur Ugni blanc (photographies A, B, C, C. Lambert) ; D, coupe transvers (Larignon *et al.* 2009).

Le champignon est présent au niveau du cep, dans la pré-nécrose brune, dans la zone brune entourant l'amadou et dans les punctuations noires (Figure 3). Du mycélium est également présent dans les rameaux et les racines et des conidies sont retrouvées dans la sève brute (Bruno *et al.* 2007; Troccoli *et al.* 2001). Le champignon se développe dans les vaisseaux de xylème et les cellules parenchymateuses (Pascoe & Cottral 2000). De récents travaux ont d'ailleurs permis de visualiser la localisation de *P. chlamydospora* grâce à une souche transformée exprimant la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) (Landi *et al.* 2012).

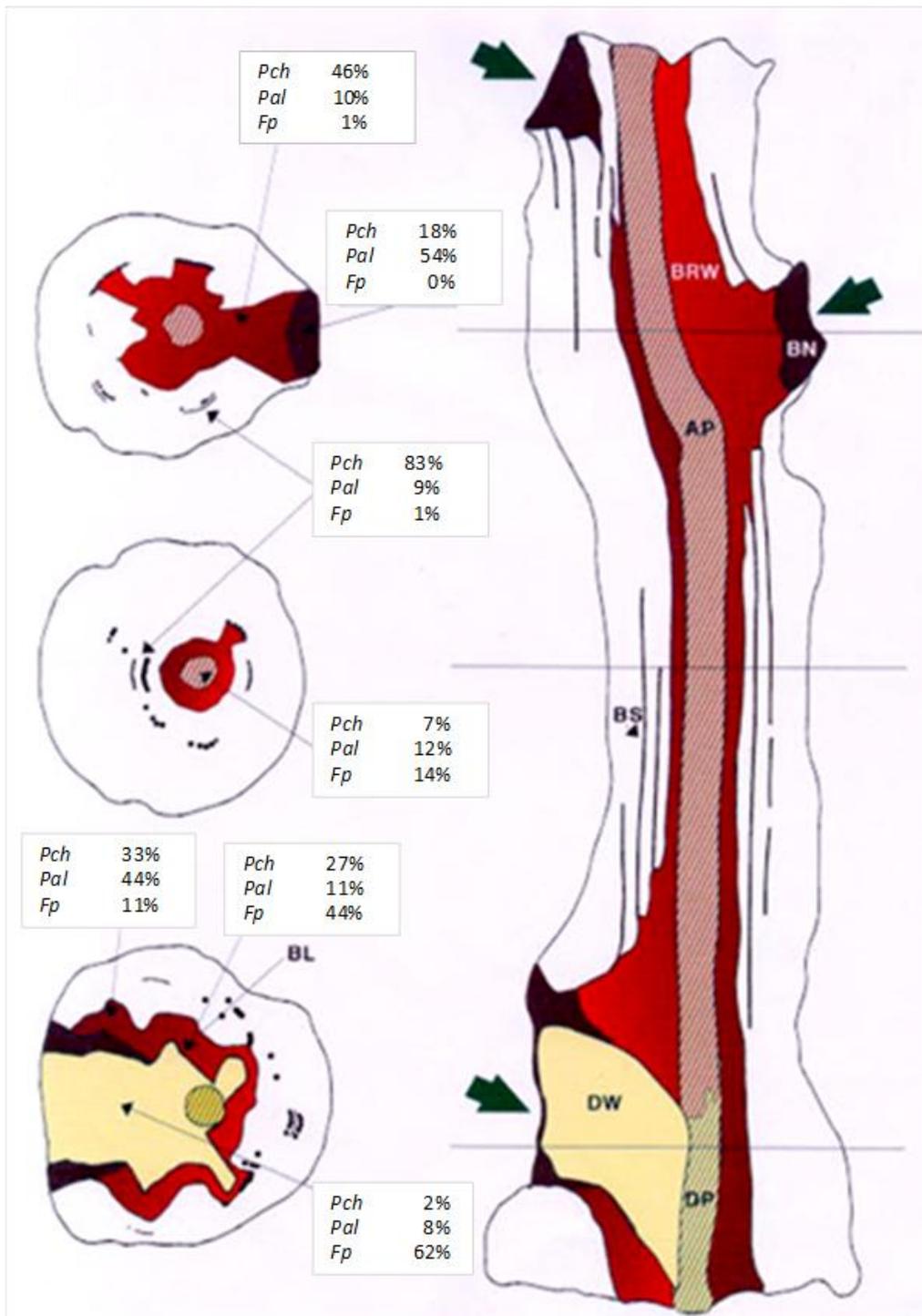
*P. chlamydospora* produit un arsenal d'enzymes impliquées dans la pathogenèse : des polygalacturonases, des polyméthylgalacturonases, des  $\beta$ -glucosidases et des  $\beta$ -1,4-glucanases, des cellulases, des xylanases et des polygalacturonases (Santos *et al.* 2006a;

Larignon 1991; Marchi *et al.* 2001). Cette fraction peptidique serait en partie responsable de la phytotoxicité de *P. chlamydospora*. Ces protéines induisent une dépolarisation membranaire en même temps qu'une modification des flux de protons H<sup>+</sup> sur des cellules de vigne et provoque leur mort (Luini *et al.* 2010). Le champignon produit également des composés phytotoxiques tels que des exopolysaccharides dont des pullulanes, polymères d'unités maltotriose liés en  $\alpha$ -1,6 (Bruno *et al.* 2007; Sparapano *et al.* 2006), le p-hydroxybenzaldéhyde (Tabacchi *et al.* 2000) et deux naphthalénones, la scytalone et l'isosclérone (Bruno & Sparapano 2006a). Les polysaccharides et les naphthalénones circulent dans la plante, *via* la sève brute et peuvent atteindre les feuilles et les baies où ils causeraient l'apparition des symptômes caractéristiques de l'esca (Bruno *et al.* 2007).

Cultivé en milieu liquide, *P. chlamydospora* excrète la scytalone, l'isosclérone et des exopolysaccharides dont les pullulanes, ainsi que des enzymes citées plus haut (Santos *et al.* 2006a ; Bruno & Sparapano 2006a ; Luini *et al.* 2010). Il a été démontré que le filtrat de milieu de culture de *P. chlamydospora* est phytotoxique pour la vigne. Absorbé par des feuilles ou des baies, il provoque l'apparition de symptômes proches de ceux de l'esca. Enfin, les polypeptides sécrétés par *P. chlamydospora* dans le milieu de culture, induisent une augmentation de l'activité phénylalanine ammonialyase (PAL) dans les cellules de vigne. La PAL est une des enzymes stimulées lorsque des cellules de vigne sont élicitées.

La présence *P. chlamydospora* et *P. aleophilum* en pépinière sur les pieds mères et le matériel de propagation (Aroca *et al.* 2010 ; Ridgway *et al.* 2002) empêche la production de plants de qualité. En plus d'être un agent de l'esca, ce champignon empêche la formation, essentielle, du cal de soudure entre le porte-greffe et le greffon (Khan *et al.* 1999 ; Santos *et al.* 2005) laissant aussi la possibilité à d'autres champignons d'entrer dans le jeune plant greffé.

*P. aleophilum* W. Gams, P.W. Crous, M.J. Wingfield & L. Mugnai, est un ascomycète de la famille des Magnaportaceae, également impliqué dans la maladie de Petri (Mugnai *et al.* 1999). Sa forme sexuée est *Togninia minima*. Il se dissémine par voie aérienne (Eskalen & Gubler 2001; Larignon & Dubos 2000) et plus particulièrement au cours de la phase végétative. Le mode de contamination au champ n'est pas connu. Néanmoins, Feliciano & Gubler (2001) ont montré que ce champignon est capable de pénétrer dans des tiges et des racines jeunes en l'absence de blessure.



**Figure 3 :** Colonisation du cep par les agents de l'esca (à gauche en section transversale ; à droite, en section longitudinale). Trois espèces fongiques ont été recherchées : *Fomitiporia punctata* (Fp), *Phaeoaniella chlamydospora* (Pch), and *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal). Les pourcentages indiqués correspondent au nombre de fois où ces espèces ont été isolées dans chaque zone. BN, nécrose brune ; BRW, bois brun-rouge ; AP, moelle altérée; BS, punctuations noires en section transversale correspondant aux stries noires en section

longitudinale; DP, moelle dégradée; BL, bordure foncée entourant la zone dégradée ; DW, bois entièrement dégradé ou amadou. (d'après Mugnai *et al.*, 1999)

Le mycélium se trouve sur les troncs et les bras excoriés (Larignon *et al.* 2009) ainsi que les tissus ligneux du tronc et des rameaux (Bruno *et al.* 2007). Des conidies ont également été identifiées dans la sève brute. Dans le tronc, *P. aleophilum* est retrouvé au niveau du bois brun-rouge et dans la pré-nécrose brune centrale (Figure 3). Le mycélium se développe dans les vaisseaux et les espaces intracellulaires (Feliciano & Gubler 2001). A l'instar de *P. chlamydospora*, ce champignon sécrète des composés phytotoxiques comme le p-hydroxybenzaldéhyde, des naphthalénone (Evidente *et al.* 2000; Tabacchi *et al.* 2000; Sparapano *et al.* 2006; Abou-Mansour, *et al.* 2004) des polysaccharides (Bruno & Sparapano 2006a) potentiellement responsables des symptômes aériens (Bruno & Sparapano 2007). En outre, ce champignon dégrade les parois cellulaires grâce à des xylanases, des  $\beta$ -glucosidases et des  $\beta$ -1,4-glucanases (Larignon 1991).

*F. mediterranea* est un basidiomycète. Il se dissémine lorsque les températures sont supérieures à 10°C et le taux d'humidité supérieur à 80% (Larignon *et al.* 2009). Sa conservation se fait sous forme de basidiomes localisés au niveau des parties malades. Ce champignon produit des composés phytotoxiques comme le p-hydroxybenzaldéhyde (Tabacchi *et al.* 2000) et des laccases capables d'oxyder des composés phénoliques (Abou-Mansour *et al.* 2009 ; Larignon *et al.* 2009). *F. mediterranea* se développe notamment au niveau du xylème (Bruno & Sparapano 2007). Il est associé à la pourriture blanche ou amadou (Figure 3) qui correspond à une dégradation totale des parois cellulaires par des xylanases, laccases, peroxydases, phénol oxydases, cellulases et  $\beta$ -1,3-glucanases.

*E. lata* est également associé à l'esca (Larignon & Dubos 1997). Ce champignon, capable de dégrader en partie les parois secondaires, contribuerait à la formation de la nécrose brune sectorielle. Il est décrit dans la section précédente en tant qu'agent responsable de l'eutypiose.

Parmi les champignons isolés dans des plants atteints d'esca on retrouve plusieurs Botryosphaeriaceae dont *D. seriata* et *B. dothidea* (Larignon & Dubos 1997; Fischer & Kassemeyer 2003; Romanazzi *et al.* 2009). Ils sont plus amplement décrits dans la section I.1.4.

### I.1.3.2. Évènements menant à la formation des nécroses

Le scénario envisagé aujourd'hui pour expliquer le développement de l'esca commence par la germination des spores de champignons pionniers : *P. chlamydospora* et *P. aleophilum* (Mugnai *et al.* 1999; Larignon & Dubos 1997). Le premier se développe longitudinalement dans le cep pour former une nécrose brune centrale. Le second se développe radialement depuis la moelle en formant une nécrose brun-rouge puis forme avec *P. chlamydospora* la nécrose brune centrale. Leur mycélium se propage dans le xylème et envahit d'autres vaisseaux et les cellules parenchymateuses adjacentes au travers des parois ponctuées (del Río *et al.* 2004). Leur caractère pionnier tiendrait à leur capacité à se développer dans un milieu riche en composés phénoliques antimicrobiens et à les détoxifier. Dans certains cas, *E. lata* contribue à la phase de colonisation en formant une nécrose brune sectorielle.

Par la suite, *F. mediterranea* va pouvoir coloniser les nécroses brunes centrales ou sectorielles. Son cortège d'enzymes lignolytiques et cellulolytiques vont lui permettre d'achever la dégradation des parois et de donner l'amadou.

### I.1.4. Le Black Dead Arm

Le Black Dead Arm (BDA) est mentionné pour la première fois en 1974 par Lehoczky en Hongrie. Ce syndrome est seulement observé en France, depuis 1999, dans le vignoble bordelais (Larignon *et al.* 2001). Peu d'informations sont disponibles à ce jour.

Les agents pathogènes impliqués sont des ascomycètes de la famille des Botryosphaeriaceae comme *Diplodia seriata* anamorphe de *Botryosphaeria obtusa* (Schweinitz), *Diplodia mutila* et *Neofusicoccum parvum* (Larignon *et al.* 2001 ; Kuntzmann *et al.* 2010). Ils sont présents à la fois au niveau du bois de vignes symptomatiques et dans des plants de pépinières (Spagnolo *et al.* 2011). Par des tests de pathogénicité, leur capacité à provoquer des symptômes dans le bois a été démontrée. D'autres syndromes de dépérissement sur vigne causés par les Botryosphaeriaceae sont décrits dans la littérature (Úrbez-Torres *et al.* 2006). Il semble que ces différentes maladies pourraient être rapprochées (van Niekerk *et al.* 2006). De nouvelles connaissances sur la phylogénie de ces agents pathogènes ont été

apportées récemment (van Niekerk *et al.* 2004 ; Pitt *et al.* 2010). Ces champignons sont aussi impliqués dans le syndrome de l'esca (Mugnai *et al.* 1999) et l'excoriose (Phillips 1998).

Les symptômes sont proches de ceux de l'esca et affectent la partie herbacée au printemps, vers la fin du mois de mai (Larignon *et al.* 2001). Au niveau du bois, la bande brune est observable sous l'écorce correspondrait à une nécrose interne. Lorsqu'une forme sévère de la maladie s'exprime, les tiges meurent, les feuilles tombent précocement, les fleurs et les fruits sèchent. Dans le cas de la forme légère, des décolorations internervaires rouges, sans liseré jaune, chez les cépages noirs (Figure 4) et jaune orangé chez les cépages blancs apparaissent sur les feuilles. C'est cette dernière caractéristique qui permettrait de distinguer esca et Black Dead Arm, bien que cela soit difficile sur cépage blanc. La similitude entre les deux types de symptômes laisse supposer qu'il s'agit de la même maladie (Lecomte *et al.* 2006).



**Figure 4** : Symptômes foliaires du black dead arm sur Merlot. (Photographies C. Lambert)

La conservation hivernale des agents du Black Dead Arm se fait sous forme de pycnides sur le cep et les bois de taille (Larignon *et al.* 2001). La dissémination des spores semble plus importante en période végétative (Brown-Rytlewski & McManus 2000 ; Kuntzmann *et al.* 2009) : les plaies causées par les travaux en vert (épamprage, rognage) sont des voies d'entrée

potentielles pour ces agents. Ils ont été détectés en pépinière à la surface et à l'intérieur des porte-greffes et des greffons.

Les Botryosphaeriaceae produisent des toxines polysaccharidiques (Martos *et al.* 2008) et des dérivés de la mélléine (Djoukeng *et al.* 2009) dont la phytotoxicité a été démontrée sur feuille mais n'a pas été reliée directement avec la pathogénicité des souches. L'analyse du protéome de *D. seriata* a mis en évidence des protéines potentiellement impliquées dans la pathogenèse (Cobos *et al.* 2010).

### **I.1.5. Facteurs influençant l'expression des symptômes de maladie du bois**

L'expression des symptômes foliaires est erratique : un cep atteint de maladie du bois exprime des symptômes avec une grande variabilité d'une année à l'autre, que ce soit dans le cas de l'esca (Surico *et al.* 2000) ou de l'eutypiose (Wicks & Creaser 2001). De même, l'incidence de ces maladies varie en fonction des régions viticoles (Fussler *et al.* 2008). L'hypothèse que des facteurs, liés à l'environnement, au matériel végétal et aux pratiques culturales, influencent l'expression des symptômes, voire le développement des pathologies du bois a été confortée au cours de ces dernières années.

Au niveau de l'environnement, le climat ainsi que les caractéristiques du sol sont les facteurs dont l'influence sur l'expression des symptômes a été étudiée. Au niveau des températures et des précipitations ce sont des tendances qui ont été identifiées. Par exemple, il semble qu'un printemps chaud diminue l'incidence des symptômes de l'eutypiose (Sosnowski *et al.* 2007). Dans le cas de l'esca, il est connu que la forme apoplectique est favorisée par un climat chaud et sec mais une corrélation directe entre température, précipitations et expression des symptômes n'a pas été établie (Surico *et al.* 2000).

Le sol de par sa capacité à retenir plus ou moins l'eau ainsi que les nutriments qu'il contient, influence la vigueur de la plante. Un sol à forte réserve utile semble favoriser l'expression des symptômes de l'esca (Surico *et al.* 2000 ; Corti *et al.* 2007 ; Calzarano *et al.* 2009 ; Marrou *et al.* 2010). Une des explications de ce phénomène pourrait être que le métabolisme de la vigne, dans des conditions hydriques non limitantes, serait orienté vers le métabolisme primaire et la croissance, alors qu'en légère contrainte hydrique, il serait tourné vers le métabolisme secondaire et la production de molécules de défense contre les agents de maladie du bois (Marrou *et al.* 2010). Une autre hypothèse est que, si la plante se trouve dans des conditions

défavorables de croissance, alors les agents pathogènes qu'elle abrite sont eux aussi ralentis dans leur développement.

Les caractéristiques du matériel végétal sont aussi mises en avant dans l'épidémiologie des maladies du bois. Il n'existe pas de cépage résistant à l'esca ou à l'eutypiose. Néanmoins, de nombreuses études ont montré que l'incidence des maladies du bois varie en fonction du cépage (Surico *et al.* 2000; Marchi *et al.* 2001; Dubos 2002; Santos *et al.* 2005; Sosnowski *et al.* 2007). Ces différences ont été confirmées lors d'inoculation de cépages distincts avec des agents des maladies du bois (Feliciano *et al.* 2004).

A partir des données de l'observatoire des maladies du bois, une classification des cépages en fonction de leur sensibilité à l'eutypiose et à l'esca a été réalisée. Le Tableau 1 présente ces résultats.

**Tableau I :** Sensibilité des cépages de *Vitis vinifera* à l'eutypiose (A) et à l'esca et au black dead arm (B). (Données issues de l'Observatoire national des maladies du bois, 2003-2008, l'incidence de la maladie est <2% pour les tolérants, de 2 à 5% pour les sensibles et >5% pour les très sensible).

**A**

Tolérants	Sensibles	Très sensibles
Melon	Muscat petit grain	Cabernet sauvignon
Savagnin	Pinot noir	Chenin
Riesling	Gamay	Sauvignon
Gewurztraminer	Chardonnay	Ugni blanc
Poulsard	Cinsault	
Trousseau	Pinot auxerrois	
Merlot	Syrah	
Carignan		

**B**

Tolérants	Sensibles	Très sensibles
Pinot noir	Chardonnay	Chenin
Syrah	Pinot auxerrois	Cinsault
Grenache	Cinsault	Riesling
Merlot		Cabernet sauvignon
Carignan		Gamay
Muscat petit grain		Ugni blanc
		Gewurztraminer
		Melon
		Sauvignon
		Savagnin

Des différences de sensibilité ont également été démontrées au niveau du clone (Jacquemain 2010) et du porte-greffe (Marchi *et al.* 2001 ; Díaz *et al.* 2009 ; Gramaje *et al.* 2010) bien que l'influence de ce dernier puisse être moindre (Eskalen & Gubler 2001).

L'âge de la parcelle semble également conditionner le niveau d'expression des symptômes qui apparaissent chez des vignes de plus de 10 ans (Fussler *et al.* 2008 ; Romanazzi *et al.* 2009) voire plus tardivement dans le cas de l'eutypiose.

Certaines pratiques culturales ont un impact sur l'expression des symptômes de l'eutypiose et de l'esca comme le système de taille (Edwards 2007) ou le moment de la taille pour l'eutypiose uniquement (Chapuis 1995 ; Munkvold & Marois 1995).

### **I.1.1. Méthodes de lutte**

Jusqu'à présent, aucun traitement curatif n'a été développé contre les maladies du bois. Des mesures préventives permettent de diminuer les risques de contaminations à la pépinière comme au vignoble. A la pépinière, plusieurs méthodes ont été testées. Les traitements à l'eau chaude se sont avérés efficaces pour diminuer les sources d'inoculum sur le matériel végétal (Crous *et al.* 2001 ; Rooney & Gubler 2001) bien que cette efficacité dépende des champignons (Casieri *et al.* 2009).

Certains fongicides ont également montré une certaine efficacité (Fourie & Halleen 2006). Le recours aux champignons antagonistes comme *Trichoderma harzanium*, ne semble pas, en revanche, fournir de résultats intéressants (Fourie & Halleen 2006).

Au vignoble, l'arsénite de sodium était considéré comme le seul traitement curatif contre l'esca, jusqu'en 2001, année où ce produit a été interdit au regard de sa toxicité. Il semble aujourd'hui que, plus qu'éradiquer la maladie, l'arsénite de sodium limitait l'expression des symptômes foliaires (Fussler *et al.* 2008). La lutte contre les maladies du bois consiste tout d'abord en des mesures prophylactiques : limiter les apports nutritifs pour contrôler la vigueur, éliminer les bois morts qui sont sources d'inoculum, éviter les tailles sévères qui augmentent la surface des plaies et le risque de contamination et pratiquer une taille tardive afin de réduire la fenêtre de contamination. Par ailleurs, les ceps malades peuvent être « régénérés » par recépage ou surgreffage.

La protection des plaies de taille a fait l'objet de nombreuses recherches. L'utilisation de fongicides a montré des résultats intéressants en expérimentation (Sosnowski *et al.* 2004). Deux produits ont d'ailleurs été mis sur le marché en France : l'Atemicep® (Sandoz Agro) et l'Escudo® (Dupont Solutions), puis ont été finalement interdits en 2003 et 2007. Depuis aucun autre produit à base de fongicide n'a été autorisé. L'utilisation de mastics, contraignante, n'est plus une piste privilégiée. Enfin, la protection préventive des plaies par l'antagoniste *T. harzanium* peut limiter le développement d'*E. lata* (John *et al.* 2005) et de *P. chlamydospora* (Di Marco *et al.* 2000). Un produit à base de *T. harzanium* est aujourd'hui le traitement préventif autorisé en France sous le nom d'Esquive® (Agrauxine) bien que la protection conférée par cette espèce ne soit pas toujours avérée au champ du moins sur *E. lata* (Larignon 2010).

Des tentatives pour développer des traitements visant à bloquer le développement des micro-organismes à l'intérieur de la plante ont été réalisées (Di Marco *et al.* 2000 ; Laukart *et al.* 2001) et demeurent sans succès ou à l'état de recherche. Des essais d'injection de fongicide dans la plante peuvent réduire les symptômes foliaires mais leur effet ne semble pas durable à ce niveau, ni même sur les nécroses (Darrietort & Lecomte 2007 ; Dula *et al.* 2007). Malgré l'identification de molécules antifongiques dirigées contre les champignons de maladies du bois, comme l'acide salicylique (Amborabé *et al.* 2005 ; Amborabé *et al.* 2002) et la synthèse de fongicides ambimobiles (i.e. systémiques et capables de transiter du phloème vers le xylème) (Jousse 2006), ces découvertes n'ont pas encore permis d'application.

Actuellement, les recherches se poursuivent selon différents axes :

- micro-organismes antagonistes (Alfonzo *et al.* 2009)
- molécules antifongiques de synthèse (Auger *et al.* 2010 ; Herche & Gubler 2010) traitements à l'ozone (Mailhac *et al.* 2010) ou au froid (Waite *et al.* 2010) pour la désinfection du matériel végétal en pépinière
- molécules élicitrices des défenses comme le chitosane (Nascimento *et al.* 2007)

## II. Mécanismes de défense de la vigne face aux champignons

Lorsque l'on s'intéresse aux mécanismes de défense des plantes, cette phrase revient régulièrement : « La maladie demeure l'exception plutôt que la règle chez les plantes ». En effet, grâce à ses défenses, une espèce végétale donnée est finalement sensible à peu de micro-organismes compte tenu de leur diversité dans les systèmes naturels. Néanmoins, pour la vigne, comme pour les autres plantes sélectionnées pour leur intérêt agronomique et économique, l'existence de parasites capables d'outrepasser les défenses végétales est un réel problème. Un problème économique, pour les agriculteurs qui doivent investir dans les traitements phytosanitaires et un problème de santé publique et environnemental quant aux effets négatifs de ces produits sur les organismes. La compréhension des mécanismes de résistance des plantes est un pré-requis pour le développement de nouvelles stratégies de lutte, alternatives aux pesticides.

La relation hôte-parasite est un équilibre entre la capacité de l'agent pathogène à coloniser la plante et les mécanismes de défense mis en place par cette dernière. Bien que la plante dispose de défenses constitutives, si elles sont franchies, la balance ne penchera en sa faveur que si elle reconnaît l'intrus et mobilise rapidement des défenses induites.

Il s'agira ici de décrire ces défenses, dans le cadre des interactions plante-champignon et plus particulièrement dans celui de la vigne.

### II.1. Les défenses passives/constitutives

Le but d'un agent pathogène est de pénétrer dans les tissus de la plante afin d'y puiser les ressources énergétiques nécessaires à son développement et à sa multiplication. Les premières barrières à franchir sont structurales : écorce, poils, cuticule, épiderme.

L'écorce, au niveau du cep et des sarments de la vigne, ou encore les poils présents sur les feuilles de certaines vitacées comme *Vitis labrusca*, ne favorisent pas l'adhésion et la germination des spores des champignons (Kortekamp & Zyprian 1999).

La cuticule, hydrophobe, est composée de cires et de cutine, un polyester d'acides gras. Elle empêche l'eau, nécessaire au développement des micro-organismes, de stagner sur les organes et crée une barrière physique (Gabler *et al.* 2003 ; Heintz & Blaich 1990). Néanmoins de nombreux champignons pathogènes produisent des enzymes capables de dégrader la cutine. La cuticule peut aussi renfermer des molécules antimicrobiennes. C'est le cas d'un composé de nature lipidique des cires épicuticulaires de jeunes baies de raisin qui possède une activité anti-germinative sur les spores de *B. cinerea* (Comménil *et al.* 1996).

Au niveau des cellules et des parois, des barrières chimiques sont mises en place. Ainsi des polyphénols, molécules antimicrobiennes, peuvent s'accumuler dans les vacuoles et imprégner dans les parois. C'est le cas des tannins catéchiques et des dérivés d'acides galliques, présents de manière constitutive dans les tissus de *V. rotundifolia*, une vitacée résistante au mildiou (Dai *et al.* 1995).

## II.2. Les défenses actives

Lorsqu'un agent pathogène contourne les défenses passives de la plante, il est impératif pour elle que la présence de l'agent pathogène soit détectée. Cette reconnaissance du parasite est une étape clé. Elle conditionne le déclenchement des systèmes de défense basés sur le renforcement des parois et la création d'un environnement toxique afin de confiner l'intrus aux cellules attaquées et d'empêcher sa propagation. Elle s'effectue par l'intermédiaire de récepteurs de la plante qui reconnaissent des motifs appelés éliciteurs. Les éliciteurs sont dit exogènes quand ils proviennent de l'agent pathogène et endogènes, quand ils sont issus de la dégradation des tissus de la plante par le parasite. On distingue généralement deux types de reconnaissance : celle des éliciteurs généraux et celle d'éliciteurs spécifiques.

La reconnaissance d'éliciteurs généraux permet à la plante de détecter des molécules dont la structure est conservée chez les micro-organismes. Ces molécules sont appelées MAMP pour « microbe associated molecular pattern » ou PAMP pour « pathogen associated molecular pattern ». Ces éliciteurs sont reconnus par des récepteurs appelés PRR pour « pattern recognition receptor ». La réponse déclenchée par cette reconnaissance correspond à un niveau basal de défense : elle permet de protéger la plante contre un organisme non hôte ou de restreindre, mais pas d'empêcher, le développement d'un organisme hôte. Ce type de reconnaissance est associé au phénomène de résistance systémique (cf. section II.5).

La reconnaissance spécifique met en jeu un récepteur, produit d'un gène de résistance *R* chez la plante, avec le produit d'un gène d'avirulence *Avr* de l'agent pathogène. Cette interaction est appelée la relation gène pour gène (Flor 1971). Elle confère une résistance propre à un agent pathogène. Elle est rapide, intense et conduit généralement à la réponse hypersensible détaillée dans la section II.4.4.

## II.2.1. Les récepteurs

### II.2.1.1. Les PRR ou « pattern recognition receptor »

Ces récepteurs correspondent à des « receptor like kinase » contenant un domaine sérine-thréonine kinase ou à des « receptor like protein » avec un domaine extracellulaire pouvant contenir un motif LRR (Leucine Rich Repeat) ou LysM (Lysin Motif). Ces récepteurs reconnaissent des motifs communs aux agents pathogènes comme des éléments constituant leur paroi. Par exemple, l'action de glucanases du soja sur la paroi de *Phytophthora megasperma* libère des oligosaccharides reconnus par une protéine membranaire (Umemoto *et al.* 1997). Deux récepteurs de la chitine, un autre polysaccharide de la paroi fongique, ont aussi été identifiés : CERK1 chez *Arabidopsis thaliana* (Miya *et al.* 2007) et CEBiP chez le riz (Kaku *et al.* 2006). Ces récepteurs peuvent aussi reconnaître des protéines impliquées dans la pathogénèse : c'est le cas de LeEIX, un récepteur d'une xylanase identifié chez la tomate (Ron & Avni 2004).

### II.2.1.2. Les gènes de résistance

Les produits des gènes de résistance sont les récepteurs de la cellule végétale impliqués dans la reconnaissance spécifique d'un agent pathogène. Ils reconnaissent les produits de gènes d'avirulence d'agents pathogènes. Les protéines codées présentent 5 domaines structuraux (Benhamou 2009) : un domaine sérine/thréonine kinases, un domaine extracellulaire LRR (Leucine Rich Repeat), un domaine CC (Coiled-Coil), un domaine NBS (Nucleotide Binding Site) et enfin un domaine TIR (Toll Interleukine Receptor) ou CC en N-terminal.

Chez la vigne, l'analyse du génome a révélé 233 gènes codant pour des protéines contenant des domaines NBS et LRR dont 84 CC-NBS-LRR et 37 TIR-NBS-LRR (Velasco *et al.* 2007). Plusieurs gènes codant pour de telles protéines sont localisés au niveau de QTL de résistance à l'oïdium et au mildiou chez des certaines Vitacées (Di Gaspero 2009, Casagrande 2011). Par exemple, deux gènes de résistance à *Plasmopara viticola*, issus de *V. riparia*, *VRP1-1* et *VRP1-2* codent pour des protéines CC-NBS-LRR (Kortekamp 2008). Les *Vitis* américaines et asiatiques représentent une ressource génétique importante et ces gènes sont des candidats pour l'amélioration de la résistance de *V. vinifera* aux maladies.

## II.2.2. Les éliciteurs

Les molécules reconnues par la plante sont appelées éliciteurs et sont de nature chimique variée. Ici ne seront décrits que les éliciteurs impliqués dans les relations plante/champignon. On distingue les éliciteurs généraux des éliciteurs spécifiques. Ces derniers, impliqués dans la relation gène pour gène, sont le produit d'un gène d'avirulence. Ils ont surtout été décrits chez *Cladosporium fulvum* un champignon pathogène de la tomate et correspondent à des protéines de faible poids moléculaires (Laugé & De Wit 1998). Une littérature abondante décrit les éliciteurs généraux, en particulier concernant la vigne. Ils sont traités dans les prochains paragraphes.

### II.2.2.1. Les éliciteurs oligosaccharidiques

La dégradation de la lamelle pectique des parois des cellules végétales par des polygalacturonases fongiques (Cook *et al.* 1999 ; Bergey *et al.* 1999) libère des oligomères d'acides  $\alpha$ -1,4-galacturoniques. Ces oligogalacturonates sont capables d'induire des réponses de défense dont l'intensité varie en fonction de la plante et de leur degré de polymérisation (Aziz *et al.* 2007). Seuls les oligogalacturonates de degré de polymérisation supérieur à 9 ont une activité élicitrice chez la vigne (Aziz *et al.* 2004 ; Poinssot *et al.* 2003).

Les  $\beta$ -glucanes, polymères d'unités glucose liées entre elles par des liaisons  $\beta$ , dérivent soit de la plante, soit du champignon. La dégradation de la cellulose végétale sous l'action des cellulases microbiennes ou inversement la dégradation de la paroi fongique par de  $\beta$ -glucanases végétales pourrait libérer des  $\beta$ -glucanes. Les  $\beta$ -1,3-glucanes isolés à partir de

l'algue brune *Laminaria digitata*, encore appelés laminarine, sont capables d'éliciter les mécanismes de défense chez la vigne et de réduire l'infection par *P. viticola* et *B. cinerea* en condition contrôlée (Aziz *et al.* 2003 ; Aziz *et al.* 2007; Trouvelot *et al.* 2008). La laminarine est commercialisée par la société Goemar sous le nom de Iodus ® dont l'usage est autorisé sur blé, orge et fraisier pour lutter contre des maladies fongiques ainsi que sur poirier, cognassier et nashi contre le feu bactérien et sur le pommier contre la tavelure.

La paroi des champignons contient également de la chitine qui peut être dégradée sous l'action de chitinases végétales. Il se forme alors des oligomères de  $\beta$ -1,4 N-acétyl glucosamine. Des oligomères de chitine désacétylée, facilement extraits de l'exosquelette de crustacés, sont appelés chitosane. Ces fragments élicitent les défenses de la vigne et, de manière corrélée, confèrent, en condition contrôlée, une meilleure tolérance à *B. cinerea* et au mildiou (Barka *et al.* 2004; Trotel-Aziz *et al.* 2006; Aziz *et al.* 2003). En plus de son action élicitrice des défenses, le chitosan possède un effet antifongique, *in vitro*, sur *B. cinerea* (Trotel-Aziz *et al.* 2006). Le chitosan est présent dans la spécialité Elexa® (Glycogenesis) homologuée aux États-Unis contre l'oïdium de la vigne.

#### II.2.2.2. Les éliciteurs peptidiques

Les élicitines sont de petites protéines (10kDa) sécrétées par les oomycètes des genres *Phytophthora* et *Pythium* (Kamoun *et al.* 1993). L'oligandrine de *Pythium oligandrum* augmente la tolérance de la vigne à *B. cinerea* (Mohamed *et al.* 2007).

Une endopolygalacturonase de *B. cinerea* a également été identifiée comme éliciteur (Poinssot *et al.* 2003). Il semble que plus que l'activité enzymatique de la protéine, ce soit la séquence peptidique qui détermine l'activité de cet éliciteur.

#### II.2.2.3. Les éliciteurs lipidiques

L'ergostérol, un composant de la membrane des cellules fongiques, est capable d'activer des enzymes de la voie de biosynthèse des stilbènes, phytoalexines de la vigne et de conférer une protection vis-à-vis de *B. cinerea* (Gomès *et al.* 2003 ; Laquitaine *et al.* 2006).

#### II.2.2.4. Les autres éliciteurs conférant une résistance aux champignons

Bien d'autres éliciteurs, qu'ils soient de synthèse, d'origine bactérienne ou encore végétale, sont capables d'induire une réponse de défense chez la vigne et peuvent conférer une résistance accrue à certains agents fongiques. Quelques molécules font l'objet d'une application agronomique.

En France, le seul éliciteur de défense bénéficiant d'une autorisation, temporaire, sur vigne, est un extrait de fénugrec, une légumineuse. Le produit est commercialisé sous le nom de Stifénia® par la société SOFT pour la lutte contre l'oïdium. Un effet protecteur contre le mildiou induit par des extraits de la rhubarbe ornementale (*Rheum palmatum*) et de la bourdaine (*Frangula alnus*) a été rapporté récemment (Godard *et al.* 2009).

Le benzo(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester ou BTH est un analogue de l'acide salicylique. Le BTH a d'abord été démontré comme inducteur de chitinases, des protéines de défense dans des cultures cellulaires de vigne (Busam *et al.* 1997a ; Busam *et al.* 1997b). Puis, il a été mis en évidence qu'au vignoble, le BTH induit la synthèse de polyphénols dans les baies, ce qui s'accompagne d'une tolérance accrue à *B. cinerea* (Iriti *et al.* 2004). Le BTH est aussi capable de conférer une meilleure tolérance à *Plasmopara viticola* (Perazzolli *et al.* 2008 ; Harm *et al.* 2011). Il est commercialisé par Syngenta sous le nom de Bion® et préconisé dans la lutte contre l'oïdium du blé et la bactériose de la tomate.

L'éthéphon, précurseur de l'éthylène, induit l'expression de plusieurs protéines de défense dans les feuilles de vigne (Belhadj *et al.* 2008 ; Jacobs *et al.* 1999) ainsi que l'accumulation de stilbènes, molécules antimicrobiennes. Ces événements sont corrélés à une meilleure protection contre l'oïdium.

L'acide jasmonique et son analogue, le méthyle jasmonate (MeJa), stimulent le dépôt de callose, l'accumulation de protéines liées à la pathogenèse et induisent la production d'acide salicylique dans les cultures cellulaires et les feuilles (Repka 2001 ; Repka *et al.* 2004; Hamiduzzaman *et al.* 2005). De plus, le MeJa stimule la biosynthèse de stilbènes dans les feuilles et les baies (Larronde *et al.* 2003). Une plus grande tolérance à l'oïdium (Belhadj *et al.* 2006) et au mildiou (Hamiduzzaman *et al.* 2005) est observée après un traitement au méthyle jasmonate ou à l'acide jasmonique, respectivement.

L'acide  $\beta$ -aminobutyrique ou BABA, est un potentialisateur, c'est-à-dire qu'il n'induit pas de réponses de défense au moment de son application mais améliore l'intensité et la rapidité de ces mécanismes en cas d'attaque d'un agent pathogène. Cette molécule améliore notamment la résistance de la vigne au mildiou (Hamiduzzaman *et al.* 2005 ; Harm *et al.* 2011). Le BABA possède également une activité antifongique directe contre *B. cinerea* (Fischer *et al.* 2009).

Un traitement sur des vitroplants de vigne par des rhamnolipides produits par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, induit l'expression de gènes codant des protéines PR et celle de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse des stilbènes. De plus, un tel traitement diminue la sensibilité de ces plants *B. cinerea* (Varnier *et al.* 2009). Ces rhamnolipides ont aussi un effet antifongique direct.

Des micro-organismes ont également montré leur capacité à induire des réponses de défense chez la vigne en condition contrôlée et à la protéger contre le mildiou pour *Trichoderma harzanium* (Perazzolli *et al.* 2008) ou contre *B. cinerea* pour une bactérie du sol du genre *Bacillus* (Paul *et al.* 1998).

Il est intéressant de noter qu'un fongicide comme le sulfate de cuivre est aussi capable d'induire des réponses de défense chez la vigne comme l'accumulation de phytoalexines (Aziz *et al.* 2006).

### II.3. La signalisation cellulaire

Après la reconnaissance, les premiers événements sont un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  via les canaux calciques membranaires, la synthèse d'oxyde nitrique et de formes actives d'oxygène ainsi que l'activation de MAP kinases et de phosphatases (Faurie *et al.* 2009). Ensuite, plusieurs voies de signalisation sont activées, principalement celles de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique et de l'éthylène qui jouent le rôle de messagers secondaires. Ces régulateurs orchestrent l'expression des gènes impliqués dans la défense. Ces gènes codent pour des protéines liées à la pathogenèse (PR protéines) ou des enzymes de la voie des phénylpropanoïdes en particulier de la voie de biosynthèse des stilbènes (Vandelle *et al.* 2006).

## II.4. Les réponses de défense induites

### II.4.1. La synthèse de protéines PR

Les protéines PR, pour « Pathogenesis Related », sont de faible poids moléculaire (10 à 30 kDa) et se caractérisent par leur solubilité, leur stabilité en milieu acide et leur résistance à la protéolyse. Ces propriétés leur permettent de se maintenir dans des environnements défavorables colonisés par l'agent pathogène. Leur localisation peut être extracellulaire, pariétale et/ou intercellulaire (Kauffmann *et al.* 1987). Elles peuvent aussi s'accumuler dans la vacuole (Bulcke *et al.* 1989). Certains ont été trouvés dans la sève brute du xylème, notamment chez la vigne (Aguero *et al.* 2008).

Initialement découvertes chez le tabac en 1970 (Gianinazzi *et al.* 1980 ; Van Loon & Van Kammen 1970), les protéines PR sont, par leur définition originale, induites par un stress biotique. Leur rôle est le plus souvent antimicrobien direct. Par exemple, les chitinases dégradent la chitine composant la paroi fongique, comme cela a été montré sur *B. cinerea* (Derckel *et al.* 1998 ; Salzman *et al.* 1998). Néanmoins, certaines d'entre elles peuvent également s'accumuler lors d'un processus physiologique ou sous l'effet d'un stress abiotique (Van Loon *et al.* 2006). Ces protéines de défense sont classées en 17 familles et à ce jour, toutes n'ont pas été identifiées chez *V. vinifera*. Chez la vigne, les protéines de défense les plus connues sont les  $\beta$ -1,3 glucanases, les chitinases et les thaumatin-like. Les  $\beta$ -1,3-glucanases et les chitinases ont une activité antifongique directe par l'hydrolyse des parois fongiques et produisent, respectivement, des fragments de  $\beta$ -1,3-glucanes et des résidus *N*-acétyl-glucosamine, qui agissent comme éliciteurs microbiens et vont renforcer la signalisation des réponses de défense. Peu de données bibliographiques sont disponibles sur les « thaumatin-like ». Toutefois, il a été rapporté que l'osmotine exerce une activité antimicrobienne *in vitro* sur *B. cinerea* (Salzman *et al.* 1998). Chez la vigne, d'autres protéines comme les « Lipid Transfer Proteins » perturbent le trafic des lipides sur les membranes des cellules fongiques qui s'en trouvent altérées.

Dans les feuilles, l'expression de gènes codant pour des chitinases et des  $\beta$ -1,3-glucanases est induite par *Plasmopara viticola* (Busam *et al.* 1997b ; Kortekamp 2006), *Erysiphe necator* (Jacobs *et al.* 1999) et *B. cinerea* (Renault *et al.* 2000 ; Robert *et al.* 2002 ; Bézier *et al.*

2002). Il a également été rapporté que l'activité glucanase augmente suite à une inoculation par *B. cinerea* (Derckel *et al.* 1999). De manière générale, l'induction de l'expression de gènes codant pour des protéines PR et la synthèse de ces dernières est modulée par le type de pathogène et une souche peu agressive ou un organisme non hôte entraînent la stimulation d'une réponse plus intense (Derckel *et al.* 1999 ; Robert *et al.* 2002 ; Kortekamp 2006). Ainsi, dans le cadre d'une interaction compatible, bien que les protéines PR soient induites elles ne parviennent pas à protéger complètement la vigne. Néanmoins, la production de chitinases et de  $\beta$ -1,3-glucanases, entre autres, peut être préalablement induite par des éliciteurs comme le méthyle jasmonate (Repka *et al.* 2004) et l'éthéphon (Jacobs *et al.* 1999) et protéger la vigne contre une attaque ultérieure d'*E. necator* (Belhadj *et al.* 2006 ; Belhadj *et al.* 2008). Les transcrits des gènes codant pour des osmotines et des «thaumatin like» et leurs protéines correspondantes s'accumulent dans les feuilles inoculées par *Phomopsis viticola*, l'agent de l'excoriose et *E. necator* (Jacobs *et al.* 1999 ; Monteiro *et al.* 2003).

Dans les baies, des chitinases, des  $\beta$ -1,3-glucanases, des « thaumatin-like » et des « Lipid transfer protein » s'accumulent au cours de la maturation (Derckel *et al.* 1998 ; Robinson *et al.* 1997 ; Salzman *et al.* 1998). Cette accumulation est fruit spécifique et, dans le cas des  $\beta$ -1,3-glucanases elle est plus importante dans la pellicule que dans la pulpe (Wang *et al.* 2009). Le développement des outils de protéomique a permis de confirmer ces résultats (Deytieux *et al.* 2007 ; Giribaldi *et al.* 2007). De par leur propriété de résistance en milieu défavorable, les protéines PR, qui s'accumulent au cours de la maturation dans les baies, résistent lors du processus de vinification. Elles sont alors susceptibles de précipiter et de causer des troubles, essentiellement dans les vins blancs (Waters *et al.* 1996) altérant la perception visuelle du consommateur.

Des chitinases peuvent s'accumuler dans des baies infectées par *Plasmopara viticola* (Robert *et al.* 2002) ou par *B. cinerea* (Bézier *et al.* 2002) et sont aussi présentes, avec des  $\beta$ -1,3 glucanases et des « thaumatin like », dans des baies infectées par *E. necator* (Jacobs *et al.* 1999).

Que ce soit dans les feuilles ou dans les baies, le niveau de l'activité chitinase et glucanase ainsi que celui de l'expression des gènes correspondants dépend de l'éliciteur (Jacobs *et al.* 1999 ; Robert *et al.* 2002), du tissu (Robinson *et al.* 1997) et du cépage (Jacobs *et al.* 1999 ; Robinson *et al.* 1997).

Les transcrits de gènes codant pour des protéines PR s'accumulent dans les feuilles de plantes infectées par des agents de maladie du bois (Rotter *et al.* 2009 ; Letousey *et al.* 2010 ; Camps *et al.* 2010). Ce sujet sera développé au point IV.3.2.

#### **II.4.2. La synthèse de phytoalexines**

L'arsenal de défense des plantes est aussi constitué de molécules antimicrobiennes non enzymatiques. Ces molécules induites par l'attaque d'un agent pathogène, ont été mentionnées pour la première fois en 1940 (Muller & Borger 1940) et sont appelées phytoalexines. Aujourd'hui, le terme phytoalexines recouvre une définition plus large, puisqu'elles peuvent être induites par des stress abiotiques.

Les phytoalexines de la vigne appartiennent à la famille des composés phénoliques : ce sont les stilbènes. Le premier stilbène identifié suite à une infection de la vigne par un champignon est le *trans*-resvératrol. Il est considéré comme le précurseur de tous les stilbènes (Langcake & Pryce 1976). Il a été rapporté que les principaux agents pathogènes fongiques de la vigne induisent la synthèse de stilbènes dans les feuilles ou les baies : *B. cinerea* (Langcake & Pryce 1977 ; Jeandet *et al.* 1995), *P. viticola* (Langcake 1981 ; Dercks & Creasy 1989) et *E. necator* (Heintz & Blaich 1990 ; Schnee *et al.* 2008). Néanmoins, la synthèse de stilbènes est plus efficace chez des *Vitis* américaines, comme *V. riparia*, ou certains cultivars de *V. vinifera* comme le Gamaret, chez qui la production de phytoalexines est plus rapide et plus intense que chez les variétés sensibles.

La section III.4 détaille plus amplement le rôle des stilbènes dans les défenses de la vigne et les sections IV.2 et IV.3.3 sont consacrées à leur potentielle implication dans la tolérance des plantes, en particulier la vigne, aux maladies vasculaires.

#### **II.4.3. Le renforcement pariétal**

Après une infection, les parois des cellules végétales peuvent être renforcées par des dépôts de substances comme la callose, les pectines, la lignine.

La callose est un polymère d'unités glucose reliées par des liaisons  $\beta$ -1,3. Le dépôt de callose est observé lors d'une infection par *P. viticola* (Gindro *et al.* 2003 ; Kortekamp *et al.* 1997) et *E. necator* (Heintz & Blaich 1990), ou lors d'une élicitation par le méthyle-jasmonate (Repka *et al.* 2004). D'autres polysaccharides comme la cellulose et des pectines mais aussi la lignine, peuvent être déposés sur les parois lors d'une induction des défenses (Lesniewska *et al.* 2004 ; Hamiduzzaman *et al.* 2005).

Les glycoprotéines riches en hydroxyproline, comme l'extensine, sont des protéines structurales de la paroi pecto-cellulosique. L'accumulation de ce type de protéine dans les parois au cours d'une infection fongique a été observée pour la première fois chez le melon atteint d'anthracnose par Esquerré-Tugayé et Mazeau (1974). La synthèse de ce type de protéines a également été notée chez la vigne en réponse à des traitements éliciteurs (Jackson *et al.* 2001 ; Repka 2004).

Entre la paroi et la membrane plasmique, au niveau du site de pénétration du champignon, peut se former un amas dense, appelé papille. Cet amas constitué de callose, de pectine, d'extensines, de composés phénoliques polymérisés et de silice (Benhamou 2009) est quasiment impénétrable pour le champignon. Des papilles ont été observées chez la vigne dans des cellules infectées par *E. necator* (Heintz & Blaich 1990 ; Ficke *et al.* 2002)

#### **II.4.4. La réponse hypersensible**

La réponse hypersensible ou HR a pour but de confiner l'agent pathogène au site d'infection. Elle se traduit par la mort des cellules au point d'entrée de l'agent pathogène, ainsi que par la production de formes actives d'oxygène et de phytoalexines. La HR est généralement le produit d'une interaction spécifique. La HR est suivie d'une résistance locale acquise (LAR) qui correspond à une hyper-activation ciblée des défenses des cellules adjacentes qui produisent notamment des composés à activité antimicrobienne et renforcent leur paroi (Klarzynski *et al.* 2000). Souvent, cette réponse hypersensible est à l'origine de la résistance systémique acquise.

La réponse hypersensible est observée chez la vigne dans le cas d'une interaction avec un agent peu virulent (Derckel *et al.* 1999) ou non hôte (Kortekamp 2006) et chez des cultivars résistants au mildiou (Casagrande *et al.* 2011).

## II.5. La résistance systémique

### II.5.1. La résistance systémique acquise

La résistance systémique acquise (SAR) ne concerne plus seulement les cellules du site de pénétration de l'agent pathogène mais s'exprime aussi dans les parties saines de la plante. Elle confère alors une résistance à un large spectre d'agents pathogènes qui peut persister plusieurs semaines (Ryals *et al.* 1996). Ce phénomène repose, le plus souvent, sur une forte accumulation d'acide salicylique ainsi que le renforcement des parois, la synthèse de phytoalexines et de protéines PR. L'acide salicylique peut migrer d'un organe infecté vers un organe sain et y induire la SAR. Néanmoins, ce phénomène est limité et de récents travaux ont montré que le signal longue distance responsable de la SAR serait le méthyle salicylate (Park *et al.* 2007) et/ou des protéines de type « Lipid Transfer » (Maldonado *et al.* 2002).

Chez la vigne, le mécanisme de la SAR a été étudié sur un modèle de boutures foliaires infectées par *P. viticola* : l'inoculation de cet agent pathogène au niveau de quelques feuilles induit l'expression d'une chitinase dans les jeunes feuilles non inoculées (Busam *et al.* 1997b).

L'induction de la SAR dépend d'une protéine, NPR1 (Non-expressor of Pathogenesis-Related genes 1) identifiée chez *Arabidopsis thaliana* (Cao *et al.* 1997). Cette protéine interagit avec des facteurs de transcription dans le noyau, aboutissant à l'expression de gènes codant des protéines PR. Un orthologue de *AtNPR1* a récemment été découvert chez la vigne, *VvNPR1.1* (Le Henanff *et al.* 2011). La surexpression de *VvNPR1.1* chez la vigne produit une protéine localisée au niveau du noyau et une surexpression de gènes codant des PR1 et 2. De plus les plants surexprimant NPR1 montrent une résistance accrue à l'oïdium.

De faible dose d'acide jasmonique, sans activer directement les réponses de défense, peuvent mettre en alerte la plante. C'est-à-dire que lors d'une nouvelle exposition à un agent pathogène, les réponses de défenses seront induites plus précocement et plus fortement. C'est le phénomène de potentialisation ou « priming » (Conrath *et al.* 2002). Il a été démontré que l'acide  $\beta$ -aminobutyrique peut induire le priming chez la vigne et protéger la plante contre le mildiou (Hamiduzzaman *et al.* 2005; Slaughter *et al.* 2008).

### II.5.2. La résistance systémique induite

Des rhizobactéries non pathogènes, par exemple du genre *Pseudomonas*, peuvent induire une résistance systémique (ISR) contre des champignons, des bactéries et des virus (Van Loon *et al.* 1998). Ce phénomène met principalement en jeu l'acide jasmonique et l'éthylène (Pieterse *et al.* 1998) et plutôt que d'induire directement la production de protéines PR, potentialiserait les réactions de défense de la plante (Conrath *et al.* 2001). Néanmoins dans certaines interactions plante/rhizobactéries des PR1 sont induites et l'ISR peut être régulée par l'acide salicylique (De Vleeschauwer & Höfte 2009).

L'ISR a été observée chez la vigne grâce à des bactéries comme *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas fluorescens* isolées au vignoble. La présence de bactéries au niveau des racines induit la production de formes actives d'oxygène et de *trans*-resvératrol dans les feuilles qui présentent alors une résistance accrue à *B. cinerea* (Verhagen *et al.* 2010).

## III. Les composés phénoliques de la vigne

Les composés phénoliques forment un groupe diversifié de métabolites secondaires largement distribués dans le règne végétal (Hattenschwiler & Vitousek 2000). Ils sont porteurs d'au moins une fonction phénol, c'est-à-dire d'un noyau aromatique lié à un ou plusieurs groupement(s) hydroxyle(s), modifié(s) ou non.

Chez les végétaux, ces composés ont des rôles variés. Ils confèrent une protection contre les UV et les herbivores, sont des signaux (allélopathie, symbiose), participent à l'attraction des pollinisateurs et des disséminateurs en tant que pigments, à la croissance, et à la réponse aux stress biotiques et abiotiques (blessures, attaque d'agents pathogènes, carences en minéraux...) (Lattanzio *et al.* 2006) Les composés phénoliques sont également étudiés en santé humaine pour leurs propriétés anti-oxydante et anti-inflammatoire et leur effet bénéfique dans la prévention du cancer, des maladies cardio-vasculaire et neurodégénératives (Fremont 2000 ; Sun *et al.* 2002 ; Iriti & Faoro 2009).

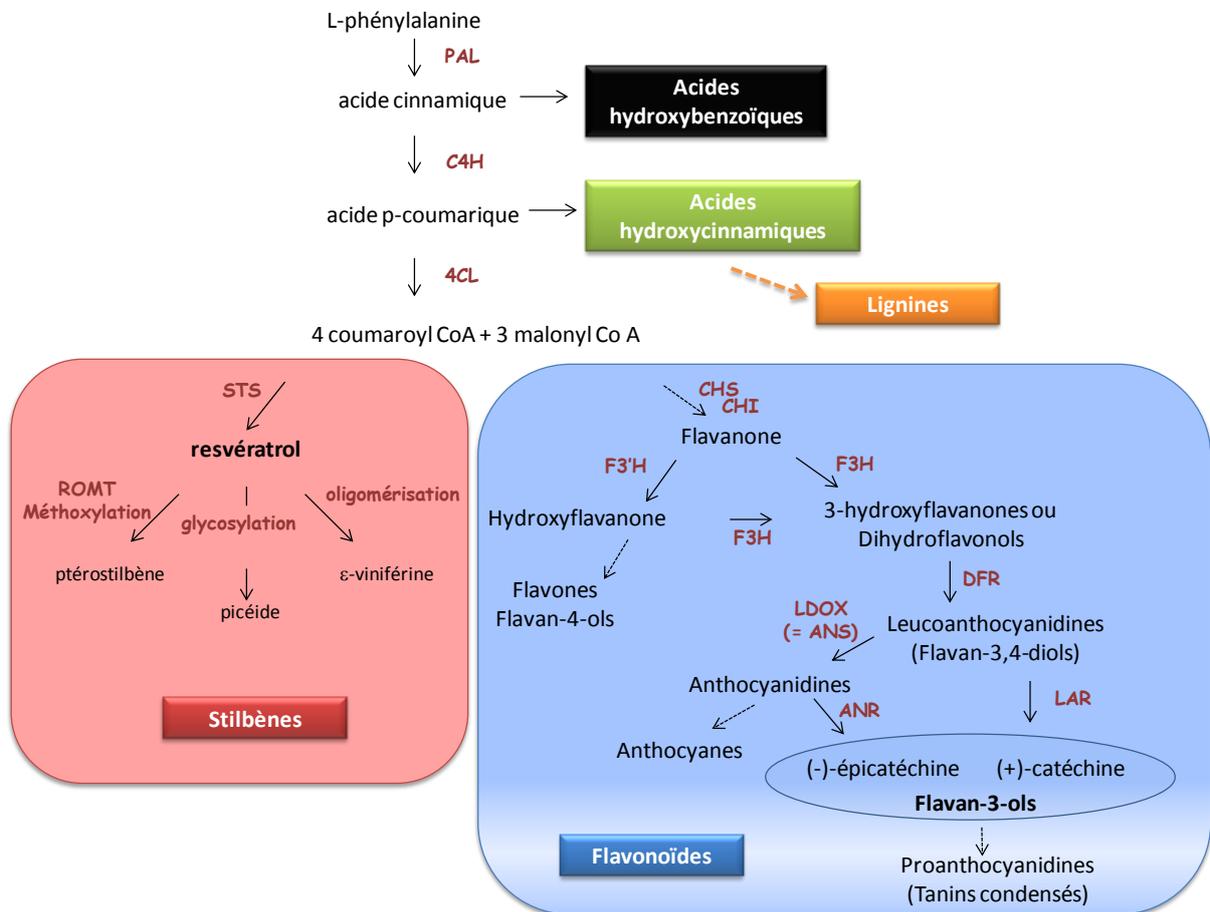
### III.1. La biosynthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont présents dans tous les organes de la vigne et peuvent être distingués en deux grandes catégories : les non flavonoïdes et les flavonoïdes.

Ces molécules dérivent de la phénylalanine d'où le nom de voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (Figure 5).

La première enzyme de cette voie est la phénylalanine ammonialyase qui catalyse la déamination de la phénylalanine pour former l'acide cinnamique. A partir de l'acide cinnamique se forment les acides benzoïques. La cinnamate-4-hydroxylase convertit l'acide cinnamique en acide *p*-coumarique, précurseur des acides hydroxycinnamiques. Les lignines dérivent notamment de certaines de ces molécules telles que les acides caféique, férulique et sinapique. Les acides benzoïques et hydroxycinnamiques forment l'ensemble des acides phénols monocycliques.

Le *p*-coumarate forme le *p*-coumaroyl-CoA *via* la 4-coumaroyl-CoA ligase. Le *p*-coumaroyl-CoA et 3 malonyl-CoA vont être les substrats de deux enzymes, la chalcone synthase et la stilbène synthase pour former des composés à deux cycles. La chalcone synthase marque le carrefour de la voie de biosynthèse vers les **flavonoïdes**. La stilbène synthase catalyse la formation du resvératrol, précurseur des autres stilbènes. Ces derniers forment avec les acides phénols les **non-flavonoïdes**.



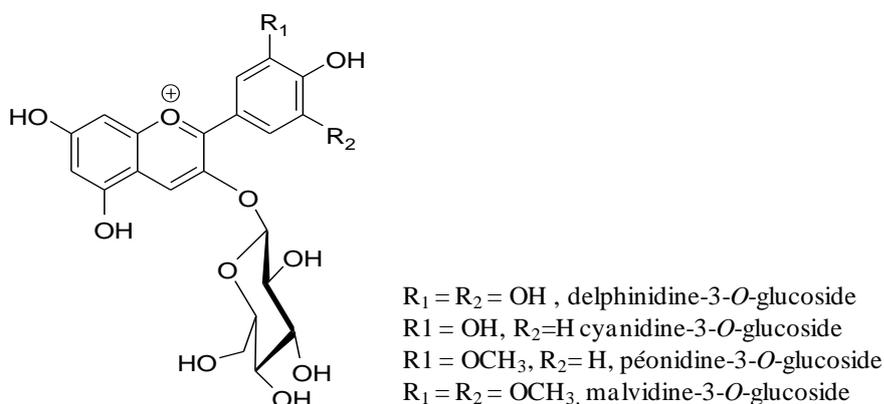
**Figure 5 :** Voie de biosynthèse simplifiée des composés phénoliques (d'après Dixon & Paiva 1995). ANR : anthocyanidine réductase ; ANS : anthocyanidine synthase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase ; 4CL : 4-coumarate : coenzyme A ligase ; CHS : chalcone synthase ; CHI : chalcone isomérase ; DFR : dihydroflavonol réductase ; F3'H : NADPH-cytochrome P450-flavonoïde 3'5'-hydroxylase ; F3H : flavanone 3-β-hydroxylase ; LAR : leucoanthocyanidine réductase ; LDOX : leucoanthocyanidine dioxygénase ; PAL : phénylalanine ammonialyase ; ROMT : resvératrol O-méthyle transférase STS : stilbène synthase.

## III.2. Les flavonoïdes

Les composés flavonoïdes ont une structure en C6-C3-C6 : deux cycles benzéniques sont reliés par un hétérocycle oxygéné pour former une unité flavane.

### III.2.1. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments dont la teinte varie du bleu au rouge en fonction de leur environnement. Elles sont caractérisées chimiquement par la présence d'une charge positive sur l'oxygène du cycle C aussi appelé ion flavylum. Les cinq anthocyanidines (aglycones) de la vigne sont la malvidine, la péonidine, la delphinidine, la pétunidine et la cyanidine. Elles sont, généralement, estérifiées par des sucres, notamment le glucose (Figure 6). Ces sucres peuvent être eux-mêmes estérifiés par l'acide acétique, *p*-coumarique ou caféique.



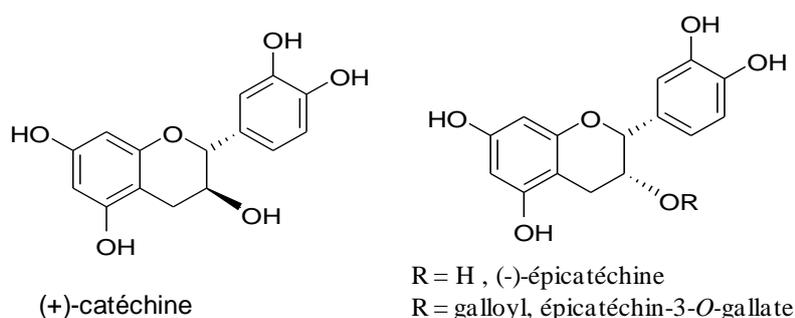
**Figure 6** : Structure des anthocyanosides de la vigne.

Elles sont présentes dans les feuilles (Guidoni *et al.* 1997 ; Ezzili *et al.* 1999) et les baies de raisin (Koeppen & Basson 1966) où elles ont un rôle protecteur contre les UV et le stress oxydant et permettent d'attirer les disséminateurs. Les anthocyanes sont solubles et s'accumulent dans les vacuoles des cellules de l'épiderme des feuilles et au niveau de la pellicule des baies de raisin.

Quelques travaux font état de l'implication des anthocyanes dans la défense des végétaux contre les champignons. Des anthocyanidines sont induites par une infection à *Colletotrichum* spp. chez le sorgho (Nicholson *et al.* 1987) et la canne à sucre (Godshall & Lonergan 1987) et leur activité antifongique a été démontrée. Chez la vigne, l'effet inhibiteur de la cyanidine et de sa forme glycosylée, sur la croissance de *B. cinerea* a été établi (Nyerges *et al.* 1975) suggérant que les anthocyanes constitutives de la baie de raisin puissent jouer un rôle dans la résistance à ce champignon. Cette hypothèse a été réaffirmée récemment (Schaefer *et al.* 2008). Néanmoins les anthocyanes ne sont généralement pas considérées comme des molécules de défense chez la vigne.

### III.2.2. Les flavanols et les tanins

Cinq monomères de flavan-3-ols existent chez la vigne (Figure 7) : (+)-catéchine, (-)-épicatéchine, (-)-épigallocatechine, (-)-épicatéchine-3-O-gallate et la (+)-gallocatechine. Ils peuvent exister en tant que tel ou s'associer et former des polymères appelés tanins, tanins condensés, tanins catéchiques ou encore appelés proanthocyanidines. Les tanins sont en concentration importante dans les pépins et la pellicule des baies de raisin où ils peuvent s'accumuler dans les vacuoles ou les parois (Gagné 2007 ; Lacampagne 2010).



**Figure 7** : Structure de trois flavan-3-ols de la vigne.

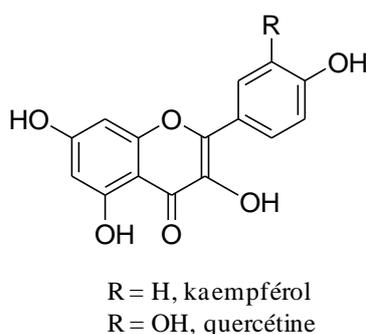
Dans les feuilles on retrouve la (+)-catéchine et en plus faible quantité la (-)-épicatéchine (Guidoni *et al.* 1997). Dans les sarments, les deux monomères sont présents à des quantités variables en fonction du cépage (Püssa *et al.* 2006 ; Luque-Rodríguez *et al.* 2006 ; Çetin *et al.* 2011). On y retrouve aussi la (+)-gallocatechine et des procyanidines B1 et B2, deux dimères de catéchine et d'épicatéchine.

Les flavanols agiraient pour partie dans l'arsenal de défense de la vigne. La catéchine, l'épicatéchine-3-O-gallate inhibent l'activité des stilbène-oxydases de *B. cinerea* (Goetz *et al.* 1999). C'est aussi le cas de tanins qui semblent contribuer à la résistance de certains cépages à la pourriture grise (Pezet *et al.* 2003). Des dérivés de la (+)-gallocatéchine sont induits par *P. viticola* dans les feuilles (Dai *et al.* 1995).

### III.2.3. Les flavonols

Les flavonols sont des pigments jaunes caractérisés par la présence d'une fonction carbonyle sur l'hétérocycle central. Ils peuvent être liés à un sucre, le plus souvent le glucose. Comme les anthocyanes, ils jouent un rôle de protection contre les UV et d'antioxydant. Ces composés sont stockés dans la vacuole et pourraient être présents dans le noyau et la membrane plasmique (Peer *et al.* 2001).

La quercétine, le kaempférol, la myricétine, l'apigénine et la lutéoline sont présents sous forme aglycone ou glycosylée dans les feuilles (Hmamouchi *et al.* 1996 ; Guidoni *et al.* 1997 ; Monagas *et al.* 2006). La lutéoline, la quercétine-3-O-glucoside et la dihydroquercétine, un flavanonol, sont mentionnées dans les sarments (Püssa *et al.* 2006; Çetin *et al.* 2011). La Figure 8 présente la structure de la quercétine et du kaempférol.



**Figure 8 :** Structure de deux flavonols de la vigne.

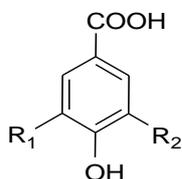
Certains flavonols inhibent la croissance de champignons pathogènes et sont parfois considérés comme des phytoalexines (Grayer & Harborne 1994). Peu d'informations sont disponibles à ce sujet chez la vigne sinon que la quercétine-3-O-glucuronide est un inhibiteur potentiel de stilbène oxydases de *B. cinerea* (Goetz *et al.* 1999).

### III.3. Les non flavonoïdes

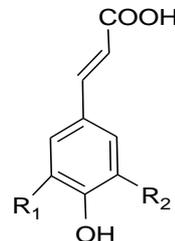
#### III.3.1. Les acides phénols

Le groupe des acides phénols est partagé en deux types d'acides : les benzoïques et les hydroxycinnamiques. Les acides benzoïques sont formés à partir de l'acide cinnamique et possèdent une structure en C6-C1. Les acides hydroxycinnamiques dérivent de l'acide *p*-coumarique, lui-même formé à partir de l'acide cinnamique par la cinnamate-4-hydroxylase. Ils peuvent se trouver sous forme d'esters tartriques (Ribéreau-Gayon 1965), d'aldéhydes (Luque-Rodríguez *et al.* 2006) ou d'hétérosides.

Au niveau des racines, les acides *p*-coumarique, férulique et caféique ont été identifiés (Weidner *et al.* 2009). Les sarments de vigne contiennent de l'acide gallique, vanillique, protocatéchique, syringique, férulique, caftarique et coutarique (Luque-Rodríguez *et al.* 2006 ; Karacabey & Mazza 2008). L'acide caféique et caftarique sont également présents dans les feuilles (Monagas *et al.* 2006 ; Hmamouchi *et al.* 1996). La Figure 9 présente quelques unes de ces structures.



R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OH , acide gallique  
 R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub> acide vanillique  
 R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub> acide syringique



R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H , acide *p*-coumarique  
 R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OH acide caféique  
 R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub> acide férulique  
 R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub> acide sinapique

**Figure 9** : Structure de sept acides phénols de la vigne.

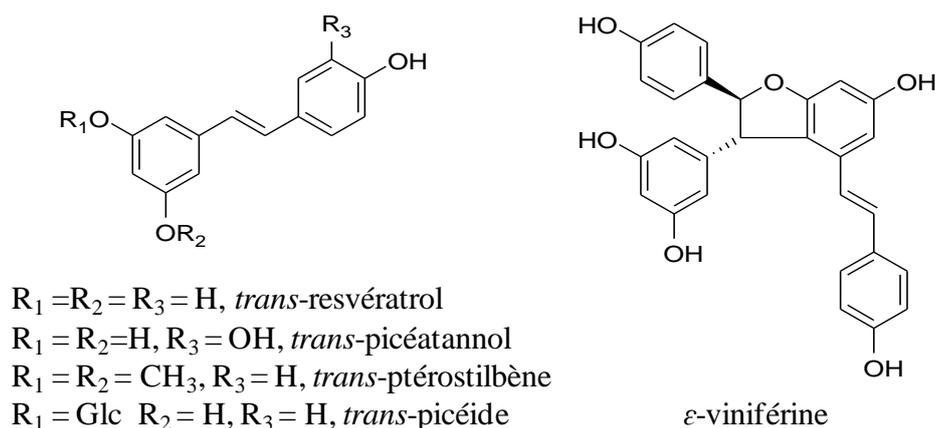
Les acides phénols ont suscité depuis longtemps de l'intérêt dans l'étude des interactions plante-pathogène (Link *et al.* 1929). Il a été démontré *in vitro* que certains acides phénols du raisin inhibent la croissance de *B. cinerea* (Nyerges *et al.* 1975) et l'activité de ses stilbène oxydases (Goetz 1999). *In planta*, les acides phénols semblent jouer un rôle dans la protection contre *B. cinerea* dans la fleur et la baie avant la véraison (Keller 2002, Pezet *et al.* 2003).

### III.3.2. Les stilbènes

Les stilbènes ont une structure en C6-C2-C6 : deux cycles benzéniques sont reliés par deux carbones, eux-mêmes unis par une double liaison. Chez la vigne, le terme hydroxystilbène serait plus correct en raison des fonctions hydroxyles présentes sur les cycles.

L'unité de base des stilbènes est le *trans*-3,5,4'-trihydroxystilbène ou *trans*-resvératrol. C'est le premier stilbène identifié chez les Vitacées, dans des feuilles de vigne soumises aux UV ou inoculées par *B. cinerea* (Langcake & Pryce 1976). Les dérivés du resvératrol varient en fonction du nombre de groupements hydroxyle, des substitutions par des sucres ou des résidus méthoxy, par leur conformation *cis* ou *trans* et par leur degré d'oligomérisation. Ces composés peuvent être induits ou constitutifs et sont présents dans toutes les parties de la vigne (Roubelakis-Angelakis 2001 ; Wang *et al.* 2010) où leur synthèse varie en fonction du tissu, de l'organe et du cépage (Creasy & Coffee 1988).

Les stilbènes dérivent de la voie des phénylpropanoïdes (cf paragraphe III.1). L'enzyme clé de leur biosynthèse est la stilbène synthase (STS, EC 2.3.1.95) qui catalyse la formation du resvératrol. Le clonage de gènes codant pour la STS a montré qu'ils forment une famille multigénique (Melchior & Kindl 1990 ; Sparvoli *et al.* 1994) et l'analyse du génome de la vigne a permis d'estimer leur nombre entre 20 et 40 gènes (Velasco *et al.* 2007 ; Jaillon *et al.* 2007). A l'échelle de la cellule, la STS est localisée dans la paroi mais aussi dans la vacuole, le cytoplasme et le noyau (Fornara *et al.* 2008 ; Wang *et al.* 2010). Les autres stilbènes sont formés à partir du resvératrol par isomérisation, glycosylation, comme le picéide, par méthylation, comme le ptérostilbène et par oligomérisation comme l' $\epsilon$ -viniférine. La glycosylation et la méthylation seraient réalisées par des glucosyltransférase et *O*-méthyltransférase. Une glucosyltransférase *V. labrusca* cv. Concorde qui produit à la fois des glucosides de stilbènes et des esters d'acides hydroxycinnamiques dans les baies (Hall & De Luca 2007). Une resvératrol-*O*-méthyl-tranférase (ROMT) et le gène correspondant ont été identifiés chez la vigne et l'expression transitoire de ce gène chez le tabac *Nicotiana benthamiana* induit l'accumulation de ptérostilbène dans les tissus du tabac (Schmidlin *et al.* 2008). L'expression de ce gène *ROMT* est d'ailleurs induite par *P. viticola*. Le processus d'oligomérisation pourrait être réalisé soit *via* des peroxydases soit non enzymatiquement (Chong *et al.* 2009). Chez *V. vinifera*, 17 monomères, 24 dimères, 6 trimères et 16 tétramères ont été identifiés (Pawlus *et al.* 2011) dont quelques structures sont données Figure 10.



**Figure 10** : Structure de cinq stilbènes de la vigne.

Le Tableau 2 et le Tableau 3 font une synthèse non exhaustive des stilbènes identifiés, respectivement, dans les tiges et les sarments de *V. vinifera* et dans les feuilles et les baies de *V. vinifera*.

**Tableau II** : Liste non exhaustive des stilbènes identifiés dans les tiges et les sarments ou le bois de *Vitis vinifera*.

Degré de polymérisation	Molécule	Référence
1	Resvératrol	Langcake & Pryce 1976
1	Picéatannol	Zga <i>et al.</i> 2009
2	ε-viniférine	Boukharta <i>et al.</i> 1996
2	Ampélopsine A	Jean-Denis 2005
2	Malibatol A	Yan <i>et al.</i> 2001
2	Ampélopsine F	Yan <i>et al.</i> 2001
3	Miyabénol C	Barjot <i>et al.</i> 2007
4	Ampélopsine H	Amalfitano <i>et al.</i> 2005
4	Vitisine C	Ito & Niwa 1996
4	Vitisine B	Ito & Niwa 1996
4	Vitisine A	Yan <i>et al.</i> 2001
4	Hopéaphénol	Yan <i>et al.</i> 2001
4	Isohopéaphénol	Yan <i>et al.</i> 2001
4	Viniférol A	Yan <i>et al.</i> 2001

**Tableau III** : Liste non exhaustive des stilbènes identifiés dans les feuilles et les baies de *Vitis vinifera*.

Degré de polymérisation	Molécule	Organe	Référence
1	Resvératrol	feuille baie	Langcake & Pryce 1976 Creasy & Coffee 1988
1	Ptérostilbène	feuille baie	Langcake & McCarthy 1979 Pezet & Pont 1988
1	Picéatannol	baie	Bavaresco <i>et al.</i> 2002
1	Picéide	baie feuille	Mattivi <i>et al.</i> 1995, Adrian <i>et al.</i> 2000 Larronde <i>et al.</i> 2003
1	Astringine	baie	Landrault <i>et al.</i> 2002
2	$\epsilon$ -viniférine	feuille baie	Langcake & Pryce 1977a b Bavaresco <i>et al.</i> 1997
2	$\delta$ -viniférine	feuille	Pezet <i>et al.</i> 2003
2	Pallidol	baie feuille	Landrault <i>et al.</i> 2002 Mattivi <i>et al.</i> 2011
2	Ampélopsine D	feuille	Mattivi <i>et al.</i> 2011
2	Quadrangularine A	feuille	Mattivi <i>et al.</i> 2011
2	$\omega$ -viniférine	feuille	Mattivi <i>et al.</i> 2011
3	$\alpha$ -viniférine	feuille	Langcake & Pryce 1977b
3	Miyabénol C	feuille	Mattivi <i>et al.</i> 2011
4	Isohopéaphénol	feuille	Mattivi <i>et al.</i> 2011
4	Ampélopsine H	feuille	Mattivi <i>et al.</i> 2011

Les stilbènes peuvent être induits par un stress abiotique, comme les UV (Langcake & Pryce 1977b) mais ils sont avant tout considérés comme les phytoalexines de la vigne : leur principale fonction serait de protéger la plante contre les agresseurs. Une littérature abondante décrit leur production en réponse aux attaques d'agents pathogènes fongiques.

### III.4. Les stilbènes, phytoalexines de la vigne

#### III.4.1. Activité antifongique des stilbènes

Les stilbènes sont connus depuis longtemps pour leurs propriétés antifongiques (Erdtman 1939). Une des premières preuves de leur implication dans les défenses de la vigne est donc leur capacité à inhiber la germination des spores et la croissance de champignons pathogènes de cette plante.

L'effet inhibiteur des stilbènes de la vigne a été testé pour la première fois sur *B. cinerea* et *P. viticola* (Langcake & Pryce 1977a, b). Lors de ces essais le resvératrol se révèle peu inhibiteur (CI50 > 200  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ) sur la germination des spores de *B. cinerea* et de *P. viticola*. Il est à noter que testé à de fortes concentrations, il n'est pas soluble. D'autres expériences ont montré que le resvératrol diminue la germination des spores de *B. cinerea* avec une CI50 de 90  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  (Adrian *et al.* 1997) et celle de *P. viticola* avec une CI50 de 110  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  (Dercks & Creasy 1989). Le resvératrol inhibe également la croissance de *Phomopsis viticola* (Hoos & Blaich 1990). Cependant, son activité demeure relativement faible (Pezet *et al.* 2004). Parmi les stilbènes déjà testés, l' $\alpha$ - et l' $\epsilon$ -viniférine donnent de meilleurs résultats : CI50 à 100 et 97  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  respectivement sur la germination des spores de *B. cinerea* et CI50 à 35 et 19  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  sur la germination des spores de *Plasmopara viticola*. Le ptérostilbène se révèle encore plus efficace que les viniférines : par exemple, sa CI50 se situe entre 18 et 24  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  pour l'inhibition de la germination des spores de *B. cinerea* (Langcake & Pryce 1979 ; (Pezet & Pont 1988). La  $\delta$ -viniférine, découverte en 2003 dans les feuilles, est tout aussi active que le ptérostilbène sur *P. viticola* (Pezet *et al.* 2003). Le picéide, glucoside du resvératrol, ne montre pas d'efficacité sur *P. viticola* (Pezet *et al.* 2004) : la glycosylation diminue l'activité et pourrait être nécessaire au stockage et/ou au transport des stilbènes.

Au-delà de la simple constatation de l'activité antifongique de ces composés, les concentrations auxquelles ils sont actifs sont comparées aux concentrations relevées *in planta*. Dans le cas des composés les plus actifs comme l' $\alpha$ -, l' $\epsilon$ - et la  $\delta$ - viniférine et le ptérostilbène les concentrations inhibitrices sont du même ordre que celles relevées dans la plante infectée par *P. viticola*, ce qui est moins vrai dans le cas d'une infection par *B. cinerea* (comparaison des synthèses de Roubelakis-Angelakis 2001 et Roubelakis-Angelakis 2009).

### III.4.2. Induction des stilbènes et résistance

Un autre moyen de démontrer l'implication des stilbènes dans les mécanismes de défense de la vigne est de corréler la biosynthèse de ces molécules au moment de l'infection avec une résistance à l'agent infectieux. La comparaison de la production de ces composés dans des cépages sensibles et résistants, notamment d'autres espèces du genre *Vitis* et des hybrides interspécifiques, est une stratégie très employée.

Les feuilles et les baies sont naturellement peu riches en stilbènes mais ces composés sont fortement induits dans le cas d'une infection fongique : par exemple l'inoculation de *B. cinerea* sur feuille, fleur ou baie induit une forte accumulation de stilbènes (Langcake & Pryce 1976 ; Keller *et al.* 2003). La comparaison de cépages de sensibilité différente à *B. cinerea* montre que plus la concentration en resvératrol est élevée dans les tissus, moins le champignon cause de lésions (Langcake & McCarthy 1979).

Des résultats similaires sont obtenus pour *Plasmopara viticola* (Dercks & Creasy 1989). Les cépages résistants accumulent plus d' $\epsilon$ - et de  $\delta$ -viniférine, des composés fortement antimicrobiens, que les cépages sensibles (Gindro *et al.* 2003 ; Pezet *et al.* 2004 ; Alonso-Villaverde *et al.* 2010). La production de phytoalexines peut d'ailleurs être utilisée comme critère de sélection des cépages résistants à *P. viticola* (Gindro *et al.* 2006). D'autres oligomères sont produits en moindre quantité dans les feuilles en réponse à *P. viticola* (Jean-Denis 2005). Cependant, on ne connaît pas leur effet sur cet agent pathogène.

Ce sont encore des observations similaires qui sont réalisées dans l'interaction vigne-*E. necator* (Schnee *et al.* 2008). La production d' $\epsilon$ - et de  $\delta$ -viniférine est corrélée positivement avec la résistance de la plante à l'agent pathogène. De plus, l'élicitation de la production de ces composés par le méthyle-jasmonate protège la vigne contre *E. necator* (Belhadj *et al.* 2006).

Les expériences de transgénèse avec des gènes *STS*, codant pour une stilbène synthase, ont largement contribué à la mise en évidence du rôle de phytoalexines des stilbènes. Le transfert d'un gène *STS* de vigne sous le contrôle d'un promoteur fort chez le tabac, confère une résistance accrue à *B. cinerea* aux plants transformés vis-à-vis des plants sauvages (Fischer & Hain 1994). Des résultats similaires ont été obtenus sur le riz, la tomate, le blé, l'orge et la luzerne (Jeandet *et al.* 2002). Une expérience sur vigne a aussi permis d'accroître la synthèse

de resvératrol et la tolérance des plantes transgéniques à *B. cinerea* (Coutos-Thévenot *et al.* 2001).

### III.4.3. Effet toxique des stilbènes : mode d'action

Le mode d'action des stilbènes sur les cellules fongiques reste mal connu malgré les apports importants des travaux de Pezet et Pont (1990, 1995). Les stilbènes affectent la respiration cellulaire (diminution de l'absorption de O<sub>2</sub>) et altèrent la structure cellulaire (dégradation des membranes des organelles, désorganisation du reticulum endoplasmique, détérioration de la membrane plasmique). Comme cela a été décrit plus haut, tous les stilbènes n'ont pas la même efficacité.

Cela dépend de leur structure et notamment des effets électroniques (Pont & Pezet 1990). Il semble que plus les substituants des cycles sont électro-attracteurs, comme les groupements OH et OCH<sub>3</sub>, plus la molécule est polarisée et plus son activité antifongique est forte. La polarisation de la molécule pourrait favoriser l'interaction des stilbènes avec les protéines membranaires entraînant une dépolarisation de la membrane et son altération. Les effets des substituants sont accentués par la présence de plusieurs systèmes conjugués présents dans tous les stilbènes qui correspondent aux cycles benzéniques, caractéristiques des polyphénols et à la double liaison entre ces cycles qui, elle, est propre aux stilbènes.

L'activité de la molécule dépend aussi de son caractère lipophile, i.e. de sa capacité à interagir avec les membranes biologiques (Schultz *et al.* 1990). Ainsi, la faible lipophilicité du resvératrol expliquerait son activité limitée. Au contraire, la forte activité du ptérostilbène viendrait de la capacité des groupements OCH<sub>3</sub> à créer des liaisons hydrogène avec les protéines membranaires.

Enfin il semble que la taille de la molécule et son isomérisation puissent jouer un rôle dans son niveau d'activité puisque les formes *cis* et certains dimères ont un effet inhibiteur supérieur à celui du *trans*-resvératrol (Hart 1981, Pezet & Pont 1990).

#### III.4.4. Détoxification des stilbènes par les champignons

L'interaction entre la plante et un agent pathogène dépend aussi bien de la capacité de la plante à empêcher l'invasion que de celle du parasite à contourner les systèmes de défense de son hôte. La détoxification des molécules antimicrobiennes par l'agent pathogène fait donc partie de la pathogénèse.

Ce phénomène est surtout étudié chez *B. cinerea* dont on sait qu'il produit des enzymes de type laccases ou stilbène oxydases, capables d'oxyder le resvératrol et le ptérostilbène pour former des composés inactifs (Hoos & Blaich 1990 ; Pezet & Pont 1988). L'oxydation conduit à la disparition des groupements hydroxyles, qui sont important pour l'activité des stilbènes (Hart 1981). La purification d'une de ces stilbène oxydases a permis de montrer que l'oxydation du resvératrol et du ptérostilbène forme des dimères comme le pallidol (Pezet *et al.* 2004 ; Breuil *et al.* 1998 ; Breuil *et al.* 1999 ; Cichewicz *et al.* 2000). Ces dimères sont très peu solubles et il est impossible de déterminer leur activité sur *B. cinerea* (Rodriguez-Bonilla *et al.* 2010). Les souches capables d'oxyder le resvératrol étant plus virulentes que celles qui n'ont pas cette capacité, on peut penser que ce processus de détoxification est bien un facteur important dans la pathogénicité des souches (Sbaghi *et al.* 1996).

D'autres champignons peuvent détoxifier les stilbènes comme *P. viticola* avec l' $\epsilon$ -viniférine (Dercks *et al.* 1995).

## **IV. Mécanismes de défenses et maladies vasculaires : cas de la vigne**

### **IV.1. Les mécanismes de défense dans le bois**

Toute blessure est une voie d'entrée pour les micro-organismes, en particulier les champignons, qui environnent les plantes. L'infection des vaisseaux conducteurs entraîne des nécroses et des détériorations des tissus jusqu'à entraîner la mort de toute ou partie de la plante. Le devenir d'une plante ligneuse dépend donc de sa capacité à se prémunir contre les agresseurs et à limiter leur dispersion.

Trois principaux modèles ont été proposés pour expliquer les phénomènes de résistance dans le bois : le CODIT (« Compartmentalization Of Decay In Tree ») (Shigo & Marx 1977), le modèle « zone de réaction » (Shain 1979) et le modèle de la restriction micro-environnementale (Boddy & Rayner 1983).

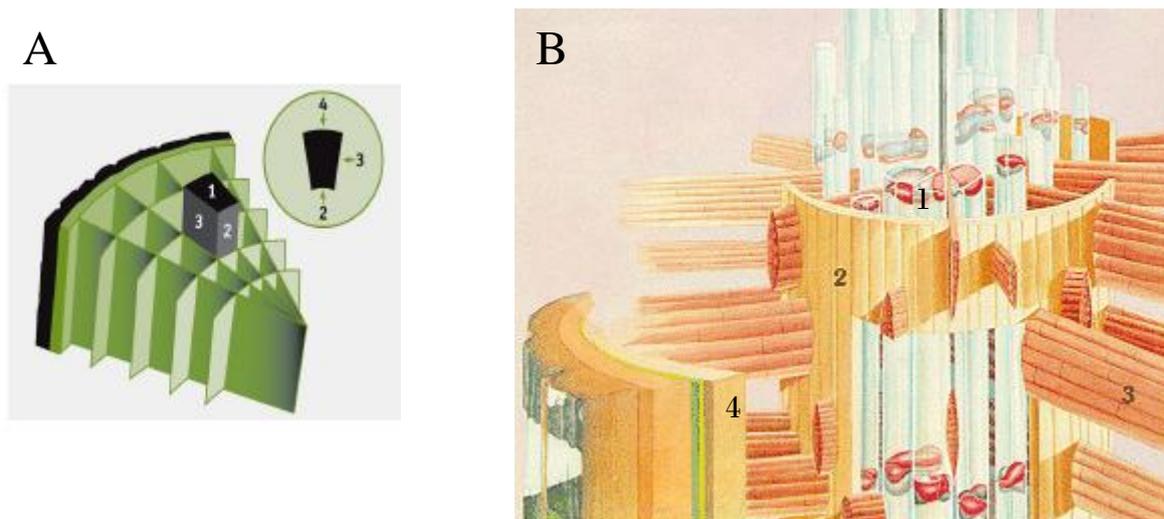
Ces modèles s'appuient sur des caractéristiques du tissu ligneux (anatomie, faible teneur en O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>) et sur l'observation des réactions induites suite à une infection fongique (Yamada 2001). Une de ces réactions est la production de composés phénoliques (lignines, stilbènes, flavonoïdes), de terpènes et de résines. Les parois des cellules sont lignifiées ou subérifiées. Les éléments du xylème sont obstrués par des substances insolubles et des thylls. Ces derniers sont des excroissances des cellules du parenchyme vasculaire qui se développent dans la lumière des vaisseaux colonisés.

#### **IV.1.1. Le CODIT**

Ce modèle, basé sur la connaissance de l'anatomie du bois, décrit les barrières structurelles mises en place pour limiter la propagation des microorganismes. Popularisée par Shigo et Marx (1977), cette théorie repose sur la formation d'un compartiment à huit faces constituées par quatre types de barrière ou mur (Figure 11).

Les faces supérieure et inférieure (mur 1) du compartiment sont constituées par de la gomme, de la pectine et des thylls qui obstruent la lumière des vaisseaux et limitent la progression longitudinale du parasite.

La face arrière, (mur 2), vers la moelle, est constituée de la dernière couche de cellules tangentiels à paroi épaisse du cerne formée l'année précédente, qui limite la progression radiale de l'agresseur.



**Figure 11 :** Schémas représentant la compartimentalisation des agents pathogènes, ou CODIT, chez les espèces ligneuses. 1 : obstruction des vaisseaux conducteurs ; 2 : dernières cellules à paroi épaisse du cerne de l'année n-1 ; 3 : rayons ligneux transversaux ; 4 : couche de cellules formées après l'infection par le cambium et susceptible de contenir des composés antimicrobiens tels que les polyphénols. (A , d'après Rioux 2004 ; B illustration de D.M. Carol Warner pour le Bulletin d'information n°419 du « United States Department of Agriculture Forest Service », 1979).

Les côtés du compartiment (mur 3) sont formés par les faisceaux ligneux composés de cellules vivantes capables de synthétiser des composés phénoliques antifongiques. La hauteur de ces faisceaux est limitée : ils forment une barrière discontinue et limitent néanmoins la propagation latérale du champignon.

Enfin, la face avant du compartiment (mur 4), vers l'écorce, est en contact direct avec le cambium. Après l'infection, l'assise génératrice formerait du tissu nouveau correspondant à une barrière de protection entre le tissu infecté à l'année n et le tissu de l'année n+1. Elle est considérée comme la barrière la plus efficace.

Les cellules et les structures composant les murs contiennent une grande quantité de subérine et de lignine dans les parois et des composés phénoliques dans les cellules (Rioux & Ouellette 1991).

#### **IV.1.2. Le modèle « zone de réaction »**

Cette théorie, développée par Shain (1979) s'appuie plus sur la production de composés inhibiteurs des champignons comme les composés phénoliques que sur des barrières anatomiques présentées ci-dessus. Deux zones sont formées à la suite d'une agression :

- une zone de réaction nécrosée et enrichie en composés phénoliques, zone correspondant aux tissus colonisés
- une zone de transition entourant la zone de réaction et à l'interface avec les tissus sains, constituée de cellules parenchymateuses vivantes capables d'accumuler des composés phénoliques ; cette zone de transition correspond aux barrières 1, 2 et 3 du CODIT

#### **IV.1.3. Le modèle de la restriction micro-environnementale**

Ce mécanisme, présenté par Rayner et Boddy (1983), est totalement différent des modèles définis précédemment. Selon les auteurs, les champignons ne parviennent pas à se développer dans le bois à cause d'un taux d'humidité trop élevé et d'une quantité de O<sub>2</sub> insuffisante. A la faveur de blessures mécaniques, ces conditions seraient modifiées (entrée d'air et dessèchement des tissus) et permettraient alors aux agents pathogènes de coloniser le bois.

### **IV.2. Polyphénols et maladies vasculaires**

Les composés phénoliques sont souvent présents de manière constitutive chez les végétaux et peuvent être induits par l'attaque d'un agent pathogène. C'est souvent le cas lorsqu'un micro-organisme colonise les vaisseaux conducteurs. Par exemple, des composés phénoliques et des

lignines s'accumulent dans les tiges et les racines du brocoli, en réponse à l'infection par *Verticillium dahliae*, un champignon parasite du xylème (Njoroge *et al.* 2011). Dans cette partie, nous nous intéresserons plus particulièrement aux maladies vasculaires cryptogamiques des arbres. La vigne étant une plante pérenne, ces modèles sont plus proches de notre sujet d'étude.

Les composés phénoliques sont fréquemment impliqués dans les mécanismes de défenses des plantes ligneuses telles que les conifères du genre *Pinus* ou *Picea*, le bouleau, le peuplier et le saule. Chez quelques conifères, un lien a été établi entre de fortes teneurs en composés phénoliques et une résistance accrue à des champignons pathogènes du bois. C'est le cas de *Pinus sylvestris*, dont les stilbènes (pinosylvine, pinosylvine monométhylether) et les flavonoïdes (pinocembrine, taxifoline) sont impliqués dans la réponse de défense de l'arbre vis-à-vis de champignons responsables de bleuissements de l'aubier (Witzell & Martín 2008).

Peu de plantes ligneuses sont capables de synthétiser des stilbènes comme les espèces des genres *Vitis*, *Pinus* ou *Picea*. Ces métabolites secondaires sont souvent cités dans les mécanismes de défense des ligneux contre les champignons pathogènes du bois. En effet, les stilbènes contribuent significativement à la résistance du bois de cœur (ou duramen) aux champignons (Hart 1981) et sont aussi considérés comme des éléments importants de la défense dans l'aubier. Ils seraient formés *in situ* au cours de la formation du bois de cœur (Hillis & Hasegawa 1963) ou lors d'une attaque parasitaire (Hillis 1968) et non pas transportés depuis les organes végétatifs vers le bois.

La variété de pin, *Pinus tadea*, produit deux stilbènes majoritaires, la pinosylvine et la pinosylvine monométhylether. Leur synthèse peut être induite par une blessure ou par la présence de *Fomes annosus*, un champignon pathogène de l'aubier. La pinosylvine et son dérivé inhibent, dans des essais *in vitro*, le développement de *F. annosus* (Hart 1981) et d'autres champignons responsables de pourriture (Schultz *et al.* 1992 ; Seppänen *et al.* 2004). L'astringine et la rhapontirine, des stilbènes glycosylés présents chez *Picea sitchensis*, démontrent également une activité antimicrobienne sur des champignons vasculaires (Woodward & Pearce 1988).

D'autres études chez *Pinus sylvestris* ont pu montrer une corrélation entre le niveau de résistance du duramen à la dégradation par un champignon et les quantités de pinosylvine et de ses dérivés dans ce tissu : plus les stilbènes sont présents moins l'arbre est sensible (Venäläinen *et al.* 2004). L'introgression d'un gène de pinosylvine synthase de *P. sylvestris*

chez le peuplier, montre que les plants transgéniques accumulent des transcrits correspondants au transgène et la présence d'une activité stilbène synthase (Seppänen *et al.* 2004). Un seul plant transgénique montrait une meilleure résistance au champignon alors que les autres étaient plus sensibles ou ne présentaient pas de modification de leur sensibilité. La présence des stilbènes en quantité importante n'explique pas, à elle seule, le phénomène de résistance (Venäläinen *et al.* 2004) mais ces composés jouent un rôle majeur dans la résistance des arbres aux champignons pathogènes du bois.

### IV.3. Maladies du bois de la vigne et défenses

Après ce qui vient d'être dit sur les mécanismes de défense chez les arbres forestiers il est légitime de se demander si de tels mécanismes pourraient être mis en place chez la vigne. La période de latence relativement longue (plusieurs années) entre l'entrée des agents de maladie du bois dans la plante et l'expression des symptômes foliaires suggère que la plante puisse retarder le développement des champignons pathogènes (Troccoli *et al.* 2001 ; Wagschal *et al.* 2008 ; Larignon *et al.* 2009). En effet plusieurs études ont montré que des phénomènes similaires à ceux décrits dans le CODIT et le modèle de zone de réaction ont lieu dans les plantes infectées par les champignons responsables de l'esca ou de l'eutypiose.

#### IV.3.1. Formation de thylls et de gommages

Les thylls font partie du mur 1 du CODIT. Ces excroissances des cellules parenchymateuses associées au xylème permettent d'obstruer les vaisseaux infectés et de limiter la progression des champignons dans le bois. Ces structures et la production de gomme ont été observées sur des ceps atteints par l'esca (Larignon 1991) et dans les tiges et les racines de plants touchés par la maladie de Petri (Del Río *et al.* 2004 ; Edwards *et al.* 2007). Les vaisseaux des tiges, du cep et des racines de plantes inoculées avec *P. chlamydospora* ou *P. aleophilum* sont aussi obstrués par des thylls (Troccoli *et al.* 2001; Del Rio *et al.* 2001).

#### **IV.3.2. Expression de gènes codant des protéines de défense**

Les protéines liées à la défense ou protéines PR sont fréquemment produites lors d'une infection par un agent pathogène fongique. Une inoculation par *E. lata* ou le développement du syndrome de l'esca induisent, dans les feuilles, l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines PR dont des osmotines, des thaumatines, des chitinases, des glucanases et des protéines inhibitrices de polygalacturonases (Rotter *et al.* 2009 ; Camps *et al.* 2010 ; Letousey *et al.* 2010). En revanche, aucune information n'est disponible quant à la présence de ces molécules dans le bois. Actuellement, des études du transcriptome du bois de vigne, infecté par des agents de l'esca et de l'eutypiose, sont menées par l'INRA de Bordeaux. Ces recherches devraient permettre de vérifier si des gènes codant des protéines PR s'expriment dans les tissus ligneux.

#### **IV.3.3. Accumulation de composés phénoliques, importance des stilbènes**

De nombreux travaux, essentiellement sur l'esca, se sont intéressés à l'évolution de ces molécules dans différents organes de la plante saine ou infectée.

Les teneurs en composés phénoliques augmentent dans la nécrose brun-rouge d'un cep atteint d'esca (Larignon 1991 ; Agrelli *et al.* 2009). Les composés accumulés seraient en particulier le resvératrol, l' $\epsilon$ -viniférine, les stilbènes constitutifs majoritaires dans le bois, ainsi que d'autres oligomères comme les ampélospine A, B et H, les leachianol F et G, l'hopéaphénol, l'isohopéaphénol et le pallidol (Amalfitano *et al.* 2000 ; Amalfitano *et al.* 2005 ; Amalfitano *et al.* 2011).

Lors d'une inoculation par *P. chlamydospora* ou *P. aleophilum*, dans les racines, les cellules adjacentes au xylème obstrué par des thylls s'enrichissent en polyphénols (Del Rio *et al.* 2001), peut-être des stilbènes (Troccoli *et al.* 2001). La quantité de polyphénols accumulée dans ces tissus est corrélée à la sévérité de l'infection. L'inoculation de *P. chlamydospora* entraîne une augmentation de la concentration en resvératrol et en  $\epsilon$ -viniférine dans les zones colonisées par le champignon voire dans les tissus sains adjacents (Martin *et al.* 2009). Les thylls contiennent eux-mêmes des polyphénols (Troccoli *et al.* 2001) et probablement des tanins (Del Rio *et al.* 2001).

D'autres informations renforcent l'hypothèse que les polyphénols sont impliqués dans les défenses de la vigne contre les maladies du bois. En effet, les teneurs en polyphénols sont liées au cépage et il semble que plus ces quantités soient élevées, plus le cépage soit tolérant aux maladies vasculaires (Bruno & Sparapano 2006a ; Bruno & Sparapano 2006b ; Martin *et al.* 2009). De plus, le traitement de vignes atteintes par la maladie de Petri par un stimulant de la synthèse des polyphénols permet de diminuer la croissance des champignons, l'expression des symptômes et la formation des thylles (Del Río *et al.* 2004). Des extraits de bois riches en polyphénols inhibent la croissance des agents du complexe de l'esca *in vitro* (Del Rio *et al.* 2001) et certains polyphénols inhibent l'activité des enzymes de dégradation de ces champignons (Del Rio *et al.* 2004).

Le syndrome de l'esca et une inoculation par *E. lata* modifient l'expression des enzymes de la voie de biosynthèse des composés phénoliques dans les feuilles. Les gènes codant pour la phénylalanine-ammonialyase ainsi que plusieurs enzymes de la voie des flavonoïdes voient leur expression augmenter (Rotter *et al.* 2009 ; Camps *et al.* 2010 ; Letousey *et al.* 2010 ; Magnin-Robert *et al.* 2011), de même que la stilbène synthase (Letousey *et al.* 2010 ; Magnin-Robert *et al.* 2011). Les teneurs en quercétine-3-O-glucoside et en acide caféique augmentent dans les feuilles de plantes touchées par l'esca (Lima *et al.* 2010).

Actuellement, des études du transcriptome du bois de vigne, infecté par des agents de l'esca et de l'eutypiose, sont menées par l'INRA de Bordeaux. Ces recherches, encore jamais entreprises, devraient apporter de nouvelles informations sur les réponses de défense de la vigne aux maladies du bois et sur le rôle des composés phénoliques dans cette interaction.

L'activité antifongique de plusieurs composés phénoliques a été testée au cours de ces dernières années. Le Tableau 4 s'attache à récapituler les molécules dont l'activité inhibitrice est avérée ou non, sur quel champignon et à quelle concentration.

**Tableau IV :** Liste non exhaustive des composés phénoliques testés pour leur activité inhibitrice de la croissance mycélienne sur les champignons associés aux maladies du bois de la vigne. (Pal : *Phaeoacremonium aleophilum*, Pch : *Phaeoconiella chlamydospora*, Fp : *Fomitiporia punctata*, Sh : *Stereum hirsutum*, Pan : *Phaeoacremonium angustius*, Tmi : *Togninia minima* téléomorphe de *P. aleophilum*, Fm : *Fomitiporia mediterranea*, Lb : *Libertella blepharis* anamorphe de *E. lata*, El : *Eutypa lata*, Pi : *Phaeoacremonium inflatipes* ; 1 : Amborabé *et al.* 2002, 2 : Bruno & Sparapano 2006c, 3 : Chapuis 1995, 4 : Coutos-Thévenot *et al.* 2001, 5 : Del Rio *et al.* 2004, 6 : Djoukeng *et al.* 2009, 7 : Mazullo *et al.* 2000, 8 : Mugnai *et al.* 1999, 9 : Santos *et al.* 2006).

Molécule testée	Champignon inhibé	Référence	Champignon non inhibé	Référence
resvératrol	Pal, Pch, Fp, Sh	7	Lb	7
	Pan, Pch	9		
	Pch, Tmi, Fm	2		
	El	4		
			Bo	6
ptérostilbène	Pal, Pch, Lb, Fp, Sh	7		
$\epsilon$ -viniférine			Bo	6
$\delta$ -viniférine			Bo	6
ac. salicylique	El	3		
	El	1		
ac. p-hydroxybenzoïque	El	3		
	El	1		
ac. gentisique	El	3		
ac. résorcylique	El	3		
ac. protocatéchique	El	3		
ac. férulique	El	3		
ac. sinapique	El	3		
ac. cinnamique	El	3		
ac. ellagique	El	3		
ac. p-coumarique	Pal, Pch, Pi, El, Sh	5		
	El	3		
(+)-catéchine	Pal, Pch, Pi, El, Sh	5		
	El	3		
acide caféique	Pal, Pch, Pi, El, Sh	5	Pch	
	Fp, Pal	8		
	El	3		
tannins	Pal, Pch, Pi, El, Sh	5		
ac. vanillique	Pal, Pch, Fp	8		
ac. gallique		3	Fp, Pal Pch	8
ac. syringique	Fp, Pal	8	Pch	8
	El	3		
ac. tannique	Fp, Pal	8	Pch	8
	Pch, Tmi, Fme	2		
		3		



# CHAPITRE 2 : Matériels et Méthodes

---

## I. Matériel végétal

Ce travail a été effectué sur deux types de matériel végétal : des boutures foliaires (herbacées) et des sarments de plantes de plein champ.

### I.1. Boutures foliaires

Deux expériences ont été menées sur boutures foliaires (herbacées). La première, en collaboration avec l'INRA de Villenave d'Ornon, a consisté à inoculer le bois des boutures de Merlot avec deux agents de maladies du bois (*D. seriata* et *N. parvum*). La seconde avait pour but d'éliciter des réactions de défense dans les feuilles de trois cépages (Cabernet-Sauvignon, Merlot et Carignan) afin de les comparer.

Les boutures foliaires de vigne sont âgées d'environ 2 mois (stade 10-12 feuilles). Ces boutures nous ont été procurées par l'UMR Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE) de l'INRA de Villenave d'Ornon. Les plantes sont produites en serre à partir de boutures à un œil. Ces boutures sont préparées à partir de sarments de l'année, fournis soit par la Chambre d'Agriculture du Vaucluse dans le cas du Cabernet-Sauvignon et du Carignan, soit par le château Olivier (Léognan, Gironde) dans le cas du Merlot. Les boutures à un œil sont placées dans des terrines de sable pour l'enracinement et le débourrement. Après 3 à 4 semaines, les plants de vigne sont repotés dans un mélange terreau/sable grossier (2/1 V/V) dans des pots de 400 ml. Ces plants sont cultivés en serre, dans un environnement contrôlé présentant un éclairage moyen de 350  $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$ , une hygrométrie variant de 60 à 70% et une température de 25°C le jour et de 20°C la nuit.

## **I.2. Sarments d'une parcelle « esca/BDA »**

Afin de comparer les teneurs en polyphénols de plantes exprimant ou non des symptômes de maladie du bois, nous avons prélevé des sarments sur une parcelle pour laquelle les notations de l'expression des symptômes d'esca et de BDA, pour chaque cep, avaient été effectuées tous les ans sur les cinq dernières années. Cette parcelle, plantée de Cabernet-Sauvignon, appartient au réseau créé par l'UMR Ecophysiologie et Génomique Fonctionnelle de la Vigne et qui avait pour but de mieux comprendre les facteurs influençant l'expression des symptômes. Outre les cinq années de notation des symptômes, la cartographie du sol par Geocarta (Marrou *et al.* 2010) a permis d'établir que la parcelle est divisée en deux zones de sol différentes : une zone de graves où la vigueur est faible et une zone d'argile où la vigueur est plus forte.

Les sarments, correspondant aux bois de l'année, ont été prélevés en janvier 2010. Au total les sarments de 67 ceps ont été récoltés dont : 14 ceps issus de la zone « graves » et 15 de la zone d'« argile » ayant exprimé des symptômes durant les 4 à 5 dernières années et 20 ceps de la zone de « graves » et 18 de la zone d'« argile » n'ayant jamais exprimé de symptômes pendant les 5 dernières années. Les bois de 2 ans portant les bois de l'année ont été également récoltés et séparé des bois de l'année. Les bois d'un an et deux ans ont été séparés en 2 lots distincts pour les analyses ultérieures.

Après récolte, les sarments sont débités au sécateur grossièrement puis séchés à l'étuve à 40°C pendant 15 jours. Par la suite, chaque échantillon est broyé successivement avec une grille 0,75 cm et sur une grille 0,75 µm.

## **I.3. Sarments de la collection INRA Villenave d'Ornon**

Dans le but de comparer les pools constitutifs de polyphénols dans les sarments de différents cépages, des prélèvements ont été réalisés sur la collection de cépages de *V. vinifera* de l'INRA de Villenave d'Ornon. En janvier 2010, les sarments de plusieurs ceps d'un même cépage ont été rassemblés pour être analysés et les cépages prélevés étaient : le Sauvignon, le Cabernet-Sauvignon, le Sémillon, le Carignan, la Syrah, l'Ugni blanc et le Merlot.

En janvier 2011, un deuxième prélèvement a été effectué. Cette fois-ci, pour chaque cépage, 2 sarments ont été prélevés sur 3 ceps distincts et analysés séparément. Les cépages prélevés étaient : le Melon, le Riesling, le Gewurztraminer, le Carignan, le Merlot, le Pinot noir, le Grenache, le Chardonnay, le Cinsault, la Syrah, le Gamay, le Cabernet-sauvignon, le Chenin, le Sauvignon, l'Ugni blanc, le Sémillon, le Sauvignon.

## II. Matériel fongique

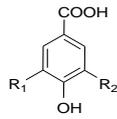
Au total, notre étude a porté sur 13 souches de champignons potentiellement impliquées dans les maladies du bois. Le Tableau 5 récapitule leur famille, nom, souche, hôte et origine.

Les souches nous ont été fournies par l'UMR SAVE (Santé et Agroécologie du Vignoble)-1065 de l'INRA de Villenave d'Ornon. Toutes les souches sont cultivées dans le noir et à température ambiante. Les champignons sont repiqués chaque semaine sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA) exceptés *P. aleophilum* et *F. mediterranea* qui sont entretenus sur Malt Agar (MA).

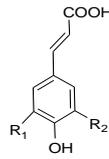
**Tableau V** : Tableau précisant les informations de systématique, d'hôte et de pays d'origine des 14 souches de champignons utilisées dans notre étude. (*A. mangium* : *Acacia mangium*)

Phylum	Famille	Espèce	Souche	Hôte	Origine
Ascomycètes	Diatrypaceae	<i>Eutypa lata</i>	BX1-10	<i>V. vinifera</i>	France
Ascomycètes	Herpotrichiellaceae	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	SO 44	<i>V. vinifera</i>	France
Ascomycètes	Togniniaceae	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	SO 21	<i>V. vinifera</i>	France
Basidiomycètes	Hymenochaetaceae	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	SO 35	<i>V. vinifera</i>	France
		<i>Neofusicoccum parvum</i>	Bp 0014	<i>V. vinifera</i>	France
		<i>Neofusicoccum parvum</i>	PER 20	<i>V. vinifera</i>	France
		<i>Neofusicoccum luteum</i>	CBS 110 299	<i>V. vinifera</i>	Portugal
		<i>Botryosphaeria dothidea</i>	OGE 14	<i>V. vinifera</i>	France
Ascomycètes	Botryosphaeriaceae	<i>Diplodia seriata</i>	PLU 03	<i>V. vinifera</i>	France
		<i>Diplodia seriata</i>	LAT 28	<i>V. vinifera</i>	France
		<i>Diplodia seriata</i>	Bo F99-1	<i>V. vinifera</i>	France
		<i>Diplodia seriata</i>	Bo F98-1	<i>V. vinifera</i>	France
		<i>Diplodia mutila</i>	BRA08	<i>V. vinifera</i>	France
		<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CBS 116 460	<i>A. mangium</i>	Costa Rica

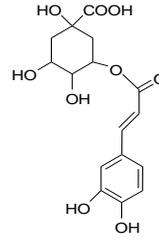
**Acides phénols**



R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OH, acide gallique  
 R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub> acide vanillique  
 R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub> acide syringique

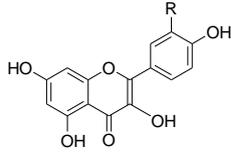


R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H, acide *p*-coumarique  
 R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OH acide caféique  
 R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub> acide férulique  
 R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub> acide sinapique



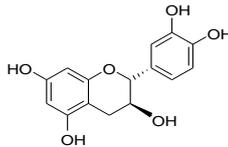
acide chlorogénique

**Flavonols**

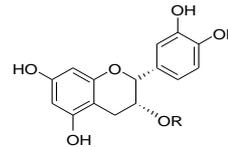


R = H, kaempférol  
 R = OH, quercétine

**Flavan-3-ols**

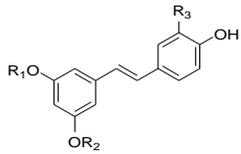


(+)-catéchine



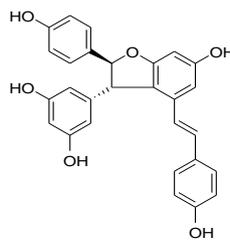
R = H, (-)-épicatéchine  
 R = galloyl, épicatechine-3-*O*-gallate

**Monomères de resvératrol**

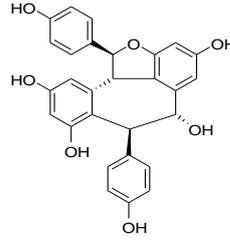


R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = H, *trans*-resvératrol  
 R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = OH, *trans*-picéatannol  
 R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = H, *trans*-ptérostilbène  
 R<sub>1</sub> = Glc R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = H, *trans*-picéide

**Dimères de resvératrol**

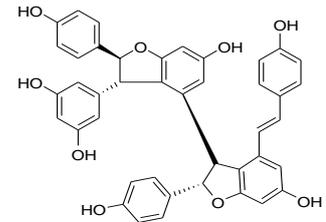


*ε*-viniférine



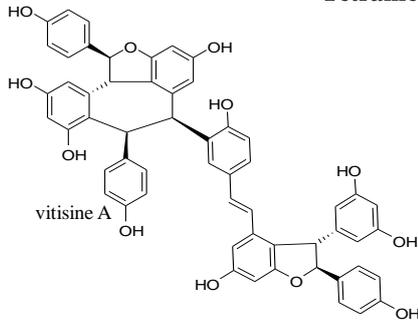
ampélopsine A

**Trimères de resvératrol**

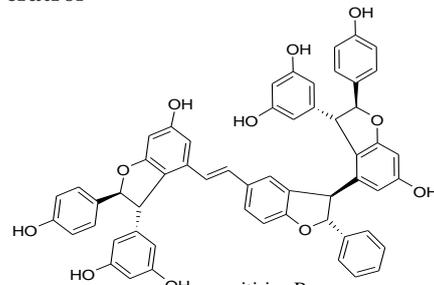


miyabénol C

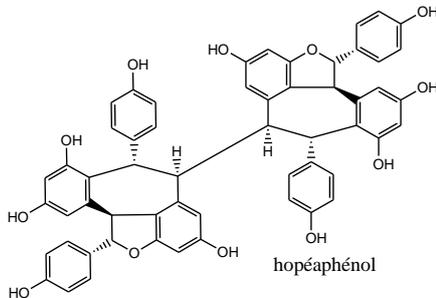
**Tétramères de resvératrol**



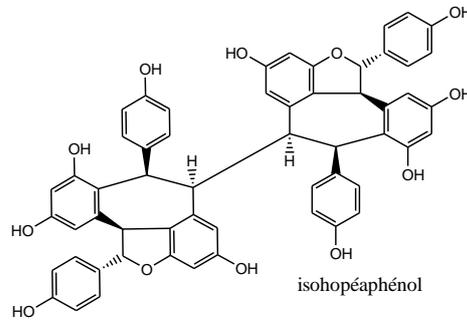
vitisine A



vitisine B



hopéaphénol



isohopéaphénol

**Figure 12 :** Structure chimique des 24 composés phénoliques utilisés dans les essais comparatifs de croissance mycélienne.

### **III. Etude de l'inhibition de la croissance mycélienne par les polyphénols**

#### **III.1. Tests comparatifs d'inhibition de la croissance mycélienne**

Les tests comparatifs ont permis d'évaluer la capacité de 25 composés à inhiber ou pas la croissance mycélienne. Les molécules que nous utilisons sont, soit achetées auprès de Sigma Aldrich, soit purifiées au GESVAB ( $\epsilon$ -viniférine, épicatechine-gallate, ampélopsine A, miyabénol C, vitisine A, vitisine B, hopéaphénol, isohopéaphénol). L'identification des composés purifiés au laboratoire est réalisée par spectrométrie de masse et par RMN. La Figure 12 récapitule les formules des 24 composés.

Les essais d'inhibition de la croissance mycélienne ont été réalisés en plaque 24 puits. Le faible volume des puits nous permet de minimiser les quantités de molécules à utiliser. En effet, les composés que nous étudions sont en majorités produits au laboratoire et disponibles en quantité limitée. Chaque composé phénolique est dissout dans l'éthanol 20%, à la concentration de 5 mM. Un volume de 25  $\mu$ l de cette solution stock est additionné à 225  $\mu$ l de milieu gélosé extrait de malt/PDB (50/50) à 40°C environ. Ce mélange, d'un volume final de 250  $\mu$ l est déposé dans un puits. La concentration finale du composé phénolique est de 500  $\mu$ M et celle de l'éthanol, 2%. Un plug de mycélium de 4 mm de diamètre est prélevé à l'aide d'un emporte pièce au niveau de la zone de croissance du champignon à tester. Ce plug est déposé au milieu de chaque puits contenant le milieu nutritif supplémenté ou non en composé phénolique. Les plaques sont placées à l'obscurité et à température ambiante. Un contrôle négatif est réalisé en additionnant au 225  $\mu$ l de milieu gélosé, 25  $\mu$ l d'une solution d'éthanol 20% pour obtenir la concentration finale de 2% d'éthanol dans le puits. Pour chaque champignon, un composé est testé au cours de trois expériences indépendantes, avec 3 puits contrôles négatifs à 2% éthanol et 3 puits contenant le polyphéol à 500 $\mu$ M et à 2% d'éthanol pour chaque expérience.

Pour déterminer les CI50 (concentration inhibant la croissance de 50%), 4 concentrations sont testées : 50, 100, 250 et 500  $\mu$ M.

La mesure de la croissance se situe entre 2 et 10 jours parès l'inoculation du puits selon la vitesse de croissance du champignon. La croissance mycélienne est évaluée en mesurant le diamètre du mycélium en 4 points différents de la surface du mycélium. En effet, le développement du champignon ne se fait pas toujours de manière uniforme et ces quatres mesures de diamètre permettent d'obtenir une meilleure appréciation de la surface du mycélium. La moyenne de ces 4 mesures est transformée en pourcentage de croissance par rapport au contrôle, considéré comme le 100% de croissance.

### III.2. Synergie entre composés phénoliques

Un effet additif ou synergique a été recherché entre quelques uns des polyphénols testés :

- entre (+)-catéchine et (-) épicatechine à 250  $\mu$ M sur tous les champignons sauf *P. aleophilum* et *P. chlamydospora*
- entre resvératrol/(+) catéchine et resvératrol/(-) épicatechine à 250  $\mu$ M sur *E. lata* et *D. seriata* BoF99-1
- entre resvératrol et picéatannol à 250  $\mu$ M sur tous les champignons sauf *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* et à 50, 100, 250  $\mu$ M sur *D. seriata* BoF99-1 et *E. lata*

Les essais sont effectués comme décrit dans la partie III.1 de sorte que la concentration finale d'éthanol soit toujours égale à 2%. Chaque expérience est réalisée une fois avec trois réplicats.

### III.3. Détection de polyphénol oxydases

Les polyphénols oxydases (PPO) sont des enzymes produites par certains champignons et sont excrétées dans le milieu afin de détoxifier les composés phénoliques nuisibles pour l'agent pathogène. L'utilisation de substrat spécifique incolore, comme le guaïacol, dont elles catalysent l'oxydation en composés colorés, permet de révéler leur présence. Une solution de guaïacol (Sigma Aldrich), diluée dans l'éthanol à la concentration de 0,1% (v:v) est additionnée au milieu de culture des champignons à raison de 250  $\mu$ l pour 5 ml de milieu. Un plug calibré de mycélium est déposé sur le milieu gélosé et maintenu à l'obscurité et à

température ambiante. La lecture est réalisée 7 jours après. L'apparition d'une coloration marron au niveau du milieu de culture révèle la présence de laccases et/ou de peroxydases.

### III.4. Suivi des teneurs en resvératrol dans le milieu

Le contenu d'un puits, soit 250  $\mu$ l de milieu gélosé, supplémenté ou non en resvératrol, inoculé ou non avec du mycélium de *E. lata* ou *F. mediterranea*, est extrait par 4 ml de méthanol pendant une nuit, sous agitation et à 4°C. Le lendemain, l'extrait est centrifugé à 2500 rpm pendant 5 minutes. Un volume de 3 ml est prélevé et évaporé au speedvac. L'extrait sec est repris dans 1 ml de méthanol/H<sub>2</sub>O (50 : 50) et 20  $\mu$ l sont analysés en HPLC (Agilent 1100 series) à 280 et 306 nm. Le gradient utilisé est présenté dans le Tableau 6. Les teneurs en resvératrol sont calculées par rapport à une gamme étalon de resvératrol pur.

**Tableau VI** : Gradient de solvant utilisé pour l'analyse des extraits de sarments en HPLC et LC-MS. Solvant A : eau à 0,1% TFA, solvant B : acétonitrile 0,1% TFA.

Temps (min)	Solvant B (%)
0	17
5	17
25	30
35	38
45	100
55	100
56	17
70	17

### III.5. Observation en microscopie électronique à balayage

*D. seriata* Bo F99-1 est cultivé en présence de ptérostilbène 500  $\mu$ M ou sur le milieu contrôle (2% éthanol) dans les conditions décrites dans la partie III. 1. Nous avons choisi de réaliser cet essai à 500  $\mu$ M, qui est la plus forte concentration utilisée dans nos expériences,

afin de pouvoir observer un éventuel effet toxique du ptérostilbène, notamment sur la morphologie des hyphes.

Le mycélium est observé directement par microscopie électronique à balayage en condition environnementale avec un microscope FEI quanta 200 (FEI company, Hillsboro, Ore., USA). Le canon à électrons est un filament de tungstène. La pression dans la chambre est de 533 Pa. La tension d'accélération varie entre 7,3 et 7,6 kV et la température de la platine Peltier est de 3°C. Le gaz présent dans la chambre est de la vapeur d'eau et le taux d'humidité est de 100%.

#### **IV. Infection de boutures par *D. seriata* et *N. parvum***

Afin de déterminer quels polyphénols peuvent être induits suite à l'infection par des agents de maladie du bois, des boutures de Merlot ont été inoculées par *D. seriata* et *N. parvum*.

Ces boutures ont été obtenues par l'UMR SAVE (Santé et Agroécologie du Vignoble)-1065 de l'INRA de Villenave d'Ornon, dans le cadre d'un projet CASDAR.

Les plantes sont des boutures foliaires de Merlot âgées deux mois (8/10 feuilles étalées) produites à partir de boutures à deux yeux. L'inoculation consiste à percer un trou à mi-hauteur du sarments bouturés et jusqu'à la moelle et à y introduire une pastille de gélose recouverte de mycélium prélevé à la marge de mycélium entretenu en boîte de pétri. L'orifice est bouché avec de la paraffine. La bouture témoin est simplement percée et le trou rebouché. Pour chaque condition, le nombre de répétitions est de 10.

Après 2 mois, le bois des boutures est récolté et congelé à -80°C jusqu'à analyse (voir partie V.2.2).

## V. Identification et dosage des polyphénols

Dans un premier temps, une extraction a été réalisée sur 50 g d'un pool de sarments de Cabernet-Sauvignon (au total 500g de sarments ont été broyés) afin d'identifier les polyphénols majoritaires, en particulier les stilbènes.

### V.1. Extraction des polyphénols, identification par LC-NMR et LC-MS

Selon le protocole de Zga *et al.* (2009), 50 g de poudre de sarments de Cabernet-Sauvignon, prélevés sont extraits par 500 ml d'un mélange acétone/eau (6 : 4). Cette opération est renouvelée une fois. L'acétone est évaporée au rotavapor. L'extrait aqueux est extrait deux fois par 250 ml d'hexane, pour éliminer notamment les acides gras, puis six fois par 250 ml de MTBE. Cette fraction MTBE contient nos composés d'intérêt. Elle est ensuite évaporée au rotavapor et lyophilisée. Environ 210 mg d'extrait sont obtenus.

L'extrait est analysé en LC-NMR (Spectromètre Bruker Avance III 600 MHz / HPLC Agilent série 1200) et les spectres sont interprétés par Tristan Richard, GESVAB. Les composés ont été analysés en mode « stop-flow » ou piégés sur cartouche en mode « SPE ».

Le resvératrol, l' $\epsilon$ -viniférine, la catéchine et l'épicatéchine sont piégés sur cartouche en mode « SPE » au cours de la chromatographie liquide. En mode « SPE », les solvants sont évaporés par séchage de la cartouche et les composés sont élués avec de l'acétonitrile- $d_3$  ( $CD_3CN$ ) vers la sonde RMN. Le piégeage sur cartouche évite l'utilisation de solvants deutérés pour l'analyse chromatographique et permet donc une économie substantielle compte tenu du coût de ces produits. Les spectres  $^1H$  sont acquis en 24 scans. La suppression des solvants résiduels (eau et acétonitrile) est réalisée par une séquence de double présaturation. Pour confirmer l'interprétation des spectres  $^1H$ , un spectre 2D-COSY (COrrélation SpectroscopY) permettant d'établir les corrélations entre protons, a été réalisé pour l'épicatéchine et la catéchine.

Les autres composés sont identifiés en mode « stop-flow ». Dans cette méthode, un flux constant d'eau deutérée (20%) est utilisé pendant l'analyse chromatographique. À chaque pic observé sur le spectre UV que l'on souhaite analyser, le flux de solvants de l'HPLC est

détourné vers la sonde RMN. Le programme de chromatographie est alors stoppé le temps de l'analyse. Cette méthode est plus adaptée pour les composés très polaires. En effet, ces derniers sont élués à un pourcentage d'acétonitrile élevé ce qui perturbe leur piégeage sur les cartouches SPE. Des spectres  $^1\text{H}$  et 2D-COSY ont permis l'identification de l'ampélospine, du picéatannol, de l'hopéaphénol, de l'isohopéaphénol et de la vitisine B.

L'identification de ces composés est également vérifiée en LC-MS et ces analyses ont été réalisées par Jonathan Bisson, doctorant au laboratoire. L'appareillage de chromatographie (Agilent 1200, Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA) est équipé d'un détecteur UV-visible-DAD. La colonne est une ProntoSil C<sub>18</sub> 250 mm x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Bischoff (Leonberg, Germany). Les conditions suivantes d'élution sont utilisées : débit de 1 ml/min, solvant A : eau à 0,1 % (v/v) d'acide formique, solvant B : acétonitrile à 0,1% (v/v) d'acide formique avec le gradient décrit dans le Tableau VI présenté en section III.4.

L'HPLC est couplée à un spectromètre de masse dont la source d'ionisation est un electrospray (Esquire 3000+) et l'analyseur une trappe ionique (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Les conditions d'ionisation et les autres paramètres du spectromètre de masse sont ceux définis par Bisson *et al.* (2011).

Une bibliothèque de référence a été réalisée précédemment avec des composés purs et identifiés par RMN au laboratoire. Cette banque contient les temps de rétention et les spectres de masse de ces composés qui peuvent être comparés à ceux obtenus à partir d'échantillons inconnus et ainsi procéder à l'identification des molécules les composant. La LC-MS a permis de confirmer l'identification des composés mis à jour en LC RMN et a identifié deux autres composés : le picéide et le miyabénol C. La LC-MS a été utilisée pour confirmer l'identité des molécules dans les extraits de sarments de la collection INRA et des boutures infectées par les Botryosphaeriaceae.

## V.2. Extraction des polyphénols, dosage

### V.2.1. Extraction et dosage des polyphénols des sarments

Environ 200 mg de poudre de sarments sont extraits par 10 ml d'acétone/eau (6 :4) pendant une nuit à température ambiante. Après centrifugation (2500 rpm, 5 min), 5 ml de surnageant sont évaporés au speedvac. L'extrait sec est repris dans 200 µl de méthanol, puis 1800 µl d'eau distillée. Deux extractions successives par 2 ml d'hexane sont réalisées. L'extrait aqueux est à nouveau extrait par trois fois 2 ml d'acétate d'éthyle. L'extrait acétate d'éthyle, qui contient nos composés d'intérêt, est évaporé au speedvac et repris dans 1 ml de méthanol 50%. Enfin, il est filtré sur un filtre nylon 0,45 µm.

Les extraits filtrés obtenus sont analysés en HPLC DAD afin de quantifier les polyphénols identifiés en LC RMN. Un volume de 20 µl d'extrait est injecté en HPLC (Agilent 1100 series) sur colonne de silice greffée C18. Le solvant A est constitué d'eau milliQ 1% TFA et le solvant B d'acétonitrile 1% TFA. Le gradient est donné dans le Tableau VI précédemment décrit.

Chaque polyphénol identifié en LC RMN est quantifié grâce à une gamme étalon réalisée avec les composés purs.

### V.2.2. Extraction et dosage des polyphénols des boutures inoculées par *D. seriata* et *N. parvum*

Les zones nécrosées des boutures inoculées par *N. parvum*, sont découpées et hachées au sécateur (environ 500 mg). Dans le cas des boutures inoculées par *D. seriata* et des boutures « témoin », les nécroses sont peu visibles ou absentes. Alors, une zone de 1,5 cm autour du site d'inoculation (environ 500 mg) est découpée et hachée au sécateur pour former des morceaux de taille inférieure à 1mm. L'extraction est ensuite réalisée comme décrit ci-dessus.

## VI. Dosage de métabolites, suivi d'expression de gènes dans les feuilles de boutures foliaires élicitées

*P. chlamydospora* a été cultivé en milieu liquide afin de préparer une solution capable d'éliciter des réponses de défense chez des boutures foliaires de Vigne. Cela a permis de comparer ces réponses de défenses entre 3 cépages de tolérance variable aux maladies du bois.

### VI.1. Préparation du filtrat de milieu de culture de *P. chlamydospora*

*P. chlamydospora* a été cultivés pendant 1 mois sans agitation, à température ambiante et à l'obscurité sur Czapeck Dox modifié (3g NaNO<sub>3</sub> ; 3g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O ; 0,5 g de KCl ; 30 g de D-glucose ; 5 g d'acide tartrique : pH ajusté à 3,2 avec KOH, qsp 1l). Puis le milieu de culture a été filtré sur toile de nylon 100µm et congelé à -20°C jusqu'à utilisation. Le filtrat de milieu de culture est décongelé et stérilisé sur membrane de cellulose 0,22 µm avant utilisation.

### VI.2. Elicitation

La méthode utilisée pour l'élicitation avait pour but de mimer l'afflux de toxines produites par *P. chlamydospora* vers les organes aériens. Chaque bouture foliaire (stade 8-10 feuilles) est coupée à sa base et trempée (Figure 13), jusqu'à 24h dans une solution contenant le milieu de culture seul (Czapek Dox) ou le filtrat de culture de *P. chlamydospora*, dilué. Dans un premier temps plusieurs dilutions sont testées : 1/5<sup>ème</sup>, 1/10<sup>ème</sup> ou 1/50<sup>ème</sup> ; puis par la suite le filtrat de *P. chlamydospora* sera utilisé dilué au 1/10<sup>ème</sup>. Les boutures foliaires traitées sont placées à 23 °C, avec une photopériode de 16 heures. Au moins trois boutures sont utilisées par condition. Les trois premières feuilles étalées en partant du haut sont ensuite prélevées et congelées à -80°C.



**Figure 13 :** Photographies illustrant le protocole d'élicitation des boutures foliaires par le filtrat de *P. chlamydospora*. La tige de la feuille est plongée dans un tube contenant le filtrat de *P. chlamydospora* dilué.

### VI.3. Dosage des stilbènes dans les feuilles

L'extraction des stilbènes contenus dans les feuilles est réalisée à partir de la matière sèche lyophilisée puis finement broyée au mortier et au pilon. Une masse de 100 mg de poudre de feuilles sont extraits par 10 ml de méthanol sur une nuit à 4 °C et sous agitation. Après centrifugation (3500 rpm, 10 min), 4 ml d'extrait méthanolique du surnageant sont évaporés au Speed Vac et repris par 1 ml de MeOH/H<sub>2</sub>O (30/70 ; v/v).

Puis, la solution est déposée sur une mini-colonne de silice greffée en C18 (SepPack®) afin d'éliminer la chlorophylle. Le conditionnement des cartouches est réalisé par lavages successifs au méthanol 100 % (2 ml), au méthanol 50 % (2 ml) et à l'eau distillée (6 ml). Après dépôt de l'échantillon (900 µl), un lavage à l'eau distillée (2 ml) est effectué avant élution des stilbènes par 4 ml de MeOH/H<sub>2</sub>O (90/10 ; v/v). L'éluat est évaporé à sec, repris par 1 ml de MeOH/H<sub>2</sub>O (50/50 ; v/v), puis filtré sur membrane de nylon (0,45 µm) avant analyse par HPLC.

Un volume de 100 µl d'échantillon est injecté automatiquement (Autosampler 708 AL ; Alcott) sur une colonne de silice phase inverse greffée C18 (Ultrasep ES100 RP18, 5 µm ; 250 x 4 mm). La détection se fait par fluorimétrie (Fluorescence Detector Prostar 363 ; Varian) avec une longueur d'onde d'excitation de 300 nm et une longueur d'onde d'émission de 390 nm. Les conditions suivantes d'élution sont utilisées : débit de 1 ml/min, solvant A :

H<sub>2</sub>O/TFA 1 % (97,5/2,5 ; v/v), solvant B : acétonitrile/solvant A (80/20 ; v/v) avec le gradient décrit dans le Tableau VII.

Les teneurs en stilbènes (*trans*-resvératrol, *trans*-picéide et  $\epsilon$ -viniférine,) des échantillons sont calculées par comparaison à des courbes d'étalonnage établies pour des composés purs (Sigma-Aldrich ou GESVAB).

**Tableau VII** : Gradient utilisé pour l'analyse des stilbènes par HPLC fluorimétrie. Solvant A : eau TFA 0,1% ; solvant B : acétonitrile/solvant A (80/20 ; v/v).

Temps	
(min)	Solvant B (%)
0	10
5	20
19	25
20	30
35	40
50	40
55	60
56	100
60	100
62	10
72	10

## VI.4. Suivi de l'expression de gènes

### VI.4.1. Extraction des ARN totaux

Le suivi d'expression de gènes est réalisé sur les feuilles congelées à -80°C puis broyées dans l'azote liquide. La méthode utilisée pour cette étude est celle de Reid *et al.* (2006). Le tampon d'extraction (300mM Tris HCl pH 8.0, 25mM EDTA, 2M NaCl, 2% CTAB, 2% PVPP, 2%  $\beta$ -mercaptoéthanol) et les solutions nécessaires à son élaboration sont réalisées avec de l'eau DEPC et sont autoclavées afin de limiter les contaminations, en particulier par les RNAases.

Après préchauffage à 65°C du tampon, 1 g de feuilles broyées est extrait dans 15 ml de tampon. Après 10 min d'incubation et agitation toutes les deux minutes, un volume égal de chloroforme/alcool isoamylique (24 :1) est ajouté au tampon et l'ensemble est vortexé vigoureusement. Après centrifugation (15 min à 3500g et à 4°C), culot et surnageant sont séparés et l'extraction chloroforme/alcool isoamylique (24 :1) est répétée sur le surnageant. A la suite d'une nouvelle centrifugation de 15 min à 3500g et à 4°C, le surnageant est additionné de 0,1 volume de NaAcétate 3M pH 5,2 et de 0,6 volume d'isopropanol. Ce mélange est vortexé et placé 30 min à -80°C afin de faire précipiter les acides nucléiques. Pour récolter le culot, une dernière centrifugation de 30 min à 3500 g, à 4°C est nécessaire. Celui-ci est alors repris dans 1 ml de tampon Tris-EDTA pH 7,5, augmenté de 0,3 volumes de LiCl 8M et conservé une nuit à 4°C pour la précipitation des ARN. Le lendemain, les ARN sont culottés par centrifugation (30 min à 20 000 g, à 4°C) et lavés par 150 µl d'éthanol 70% froid. A la suite d'une centrifugation (10 min à 20 000 g, à 4°C), le surnageant est éliminé, le culot est séché et enfin repris dans 50 à 150 µl d'eau.

#### **VI.4.2. Elimination de l'ADN génomique**

Les échantillons sont systématiquement traités à la désoxyribonucléase (DNase) afin d'éliminer toute trace d'ADN génomique. L'extrait contenant 15µg d'ARN totaux est mélangé à 10 unités de DNase dans un tampon 10X (200mM TrisHCl, 20 mg MgCl<sub>2</sub>, pH 8,3) qsp 200µl d'eau DEPC. Le mélange est incubé à 37°C pendant 30 minutes puis la réaction est stoppée par 50µl d'EDTA à 50 mM. Une extraction phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1 ; v/v/v) est ensuite réalisée pour éliminer les protéines du mélange réactionnel. Après agitation au vortex pendant 5 min et centrifugation à 13000 rpm à température ambiante, la phase aqueuse est récupérée et les ARN qu'elle contient sont précipités pendant au moins 2h à -80°C par addition de 0,1 volume d'acétate de sodium 3M, pH 5,2 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu froid. Les échantillons sont centrifugés à 30 min à 13000 rpm et à 4°C puis le culot est lavé par 1 volume d'éthanol 70% (v/v), séché sous hotte et enfin remis en suspensions dans 15 µl d'eau traitée au DEPC. Des amplifications par PCR avec des amorces permettant d'amplifier un gène codant pour l'actine sont réalisées à partir d'ARN totaux afin de vérifier qu'aucune contamination par de l'ADN génomique ne persiste.

### VI.4.3. Quantification et vérification de l'intégrité des ARN

La concentration des ARN totaux est estimée par la mesure de l'absorbance à 260 nm qui correspond à leur maximum d'absorption. Des mesures d'absorbance à 230 et 280 nm sont également effectuées afin d'évaluer la présence de sucres et des protéines. Le rapport A260 nm/A280 nm évalue la contamination protéique et doit être proche de 2. Le rapport A260 nm/A230 nm est un indice de la présence de sucres et doit être compris entre 1,8 et 2. Leur intégrité est vérifiée par dépôt de 1 µg d'ARN totaux sur gel d'agarose 1,5% (p/v) dissout dans du tampon TAE 1X (40 mM Tris-Acétate, 1mM EDTA) et à 0,01% (v/v) de GelRed™ pour la révélation des acides nucléiques. La migration se fait dans du TAE 1X sous un voltage de 100 mV. Les acides nucléiques étant chargé négativement, ils migrent vers l'anode, en fonction de leur masse et de leur encombrement stérique. L'observation de deux bandes majoritaires, correspondant aux ARN ribosomiques 28S et 18S, ARN les plus abondants dans les extraits, indique que les ARN ne sont pas dégradés.

### VI.4.4. Synthèse des ADN complémentaires

Les ARN messagers, contenus dans les extraits d'ARN totaux, sont utilisés comme matrice pour la synthèse d'ADN complémentaires (ADNc) par la technique de transcription inverse (RT).

Un microgramme d'ARN totaux est mélangé avec 1 µl d'oligo(dT) (0,5 µg.µl<sup>-1</sup>) et le volume est complété à 5 µl d'eau traitée au DEPC. Les acides nucléiques sont dénaturés par chauffage à 70°C pendant 5min puis placés dans la glace afin d'éviter la reformation de structures secondaires. La synthèse d'un simple brin d'ADNc est réalisée à 42°C pendant 1h après ajout dans chaque tube de : 6,5 µl d'eau stérile, 4 µl de tampon de transcription inverse RT 5X buffer (Promega), 2 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µl dNTP 10 mM, 0,5 µl de RNasin, inhibiteur de RNase (Promega) et 1 µl de transcriptase inverse (Promega).

La réaction enzymatique est stoppée par chauffage à 70°C pendant 15 min. Les ADNc sont dilués au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'eau stérile et stockés à -20°C. Une PCR de contrôle permet de vérifier que la synthèse des ADNc a été effective.

#### VI.4.5. Amplification par PCR en temps réel

Afin de déterminer le nombre de copies d'ARNm des gènes d'intérêt, une PCR quantitative a été réalisée en utilisant la méthode du SYBR Green®. Cet intercalant, une fois lié au double brin d'ADN, émet une fluorescence qui est mesurée directement dans le tube PCR à l'aide d'un fluorimètre couplé à un thermocycleur (MyiQ, Bio-rad). Les « threshold cycle » ou cycles seuil correspondent au nombre de cycles à partir desquels la fluorescence émise par les produits de PCR est égale au seuil de détection du fluorimètre, le seuil de détection étant significativement plus élevé que le niveau de base de fluorescence.

Les réactions de PCR ont été réalisées sur trois réplicats biologiques. A 12,5 µl de tampon 1X SYBR Green® Quantitect© (Qiagen) (comprenant la Taq polymérase, les dNTP, le SYBR Green I) sont ajoutés 0,5µl de chaque amorce (10 µM), 10 µl de matrice d'ADNc à 10 ng/µl et le volume est complété à 25 µl avec de l'eau traitée au DEPC.

Après une dénaturation initiale à 95°C pendant 15 min, 45 cycles d'amplification sont réalisés comme suit : 15 s de dénaturation à 95°C, 30 s d'hybridation à 60°C et 30 s d'extension à 72°C. La fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation.

Pour vérifier la spécificité de la réaction de PCR, les courbes de fusion sont obtenues par dénaturation à 95°C pendant 1 min, hybridation à 55°C pendant 1 min puis la température est incrémentée par paliers de 0,5°C. La fluorescence est mesurée à chaque palier.

Pour chaque couple d'amorces, l'efficacité de PCR était comprise entre 80 et 100%.

#### VI.4.6. Amorces utilisées

Les amorces utilisées pour l'étude de l'expression des gènes en PCR quantitative sont présentées dans le Tableau VIII. Huit gènes sont étudiés. Parmi eux, deux gènes constitutifs EF1 codant le facteur d'élongation 1 et le gène de l'actine permettent de normaliser l'expression des gènes d'intérêt. Seul EF1 est utilisé pour les calculs.

Les amorces ont été définies préalablement (Belhadj *et al.* 2006) et leur spécificité vérifiée. Les amorces sont dessinées de sorte à amplifier un fragment de 100 paires de base, à une température d'hybridation de 60°C pour chacun des couples, leur taille étant comprise entre 18 et 25 paires de base et leur % GC avoisinant 50%.

**Tableau VIII :** Nom et numéro d'accèsion des gènes suivis et séquences des amorces correspondantes utilisées en PCR quantitative. *PAL* : phénylalanine ammonialyase, *STS* : stilbène synthase, *PGIP* : protein inhibitrice de polygalacturonase, *PIN* : inhibiteur de protéase, *CHIT4C* : chitinase de classe IV, *GLU* : bêta-glucanase, *EF1* : facteur d'élongation 1, *ACT* : actine.

Gènes	Numéro	Amorce directe (5'-3')	Amorce reverse (5'-3')
	d'accèsion NCBI ou TC TIGR		
<i>PAL</i>	X755967	TGCTGACTGGTGAAAAGGTG	CGTTCCAAGCACTGAGACAA
<i>STS</i>	AF274281	GTGGGGCTCACCTTTCATT	CTGGGTGAGCAATCCAAAAT
<i>PGIP</i>	AF305093	ACGGAACCTGTTCCAGTTTGAT	CGATTGTAACCTCACGTTTCAGGA
<i>PIN</i>	AY156047	GCAGAAACCATTAAGAGGGAGA	TCTATCCGATGGTAGGGACACT
<i>CHIT4C</i>	AY137377	GGCGACGAATCCATTTATGTTA	CGGAACAAGGGTTTCATAATTC
<i>GLU</i>	AF239617	TACCTCTTTGCCATGTTTGATG	AGTACTTCGGCTGTTTGTGTTGG
<i>EF1</i>	TC31634	TGAAGAATGGTGATGCTGGA	CAACAGTTTGACGCATGTCC
<i>ACT</i>	TC30205	TCAGCACTTTCAGCAGATG	TAGGGCAGGGCTTCTTTCT

#### VI.4.7. Construction de la gamme étalon

Une courbe-étalon est réalisée en utilisant des matrices de nombres de copies connus ( $10^3$  à  $10^8$  copies) de la séquence cible. Les séquences cibles ont été préalablement clonées dans le vecteur pGEM®-T Easy Vector (Promega). Une mini-préparation d'ADN permet de purifier les plasmides contenant les séquences cibles. Une PCR de contrôle permet de vérifier que les inserts correspondent à nos séquences cibles. Un dosage à 260 nm des solutions de plasmides permet de déterminer le nombre de copies de séquences cibles par le calcul suivant :

$$(\text{nombre de moles}) (6.02 \times 10^{23}) = \text{nombre de copies}$$

La courbe-étalon correspond au cycle seuil (Ct threshold cycle) en fonction du logarithme de la quantité initiale d'échantillon standard. Cette gamme nous permet essentiellement de déterminer l'efficacité de la PCR. Le coefficient de corrélation  $R^2$  était supérieur à 0,95 pour chaque gène.

#### VI.4.8. Expression des résultats par la méthode $\Delta\Delta Ct$

Afin de normaliser nos résultats, nous avons utilisé le gène codant pour le facteur d'élongation EF1 comme témoin interne et l'échantillon T0 (temps 0h) comme référence (calibrator). Nous avons choisi la méthode  $\Delta\Delta Ct$  pour l'expression relative des gènes (Winer 1999) et la formule suivante a été appliquée (GI : gène d'intérêt) :

$$\text{Facteur d'induction} = 2^{-[\Delta\Delta Ct]}$$

$$\Delta\Delta Ct = [Ct_{GI} (\text{échantillon inconnu}) - Ct_{EF1} (\text{échantillon inconnu})] - [Ct_{GI} (\text{échantillon référence}) - Ct_{EF1} (\text{échantillon référence})]$$

## VII. Analyse statistique

Le test t de Student est un test paramétrique de comparaison de moyenne 2 à 2 et il a été réalisé sous excel (Microsoft Corp., Redmond, USA).

Les tests de Mann & Whitney (test non-paramétrique de comparaison de moyenne 2 à 2) ont été réalisés avec les utilitaires de l'association Anostat.

Les analyses ANOVA de Kruskal-Wallis (test non-paramétrique de comparaison multiple de moyenne) ont été réalisés sous Statistica 10.



# CHAPITRE 3 : Caractérisation des stilbènes du bois de la vigne

---

Les tissus ligneux de la vigne, *V. vinifera*, renferment de nombreux stilbènes présents de manière « constitutive ». La plupart d'entre eux sont connus. Le *trans*-resvératrol et l' $\epsilon$ -viniférine, ont été fréquemment rapportés par plusieurs auteurs comme étant des stilbènes constitutifs des tissus ligneux de la vigne (Langcake & Pryce 1976 ; Pussä *et al.* 2006). D'autres polyphénols comme la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine ou encore le *trans*-picéatannol ont également été démontrés comme présents dans le bois (Pussä *et al.* 2006 ; Zga *et al.* 2009). Le resvératrol et l' $\epsilon$ -viniférine sont, à notre connaissance, les seuls stilbènes à avoir déjà été quantifiés dans les sarments (Langcake & Pryce 1976 ; Roubelakis-Angelakis 2001, Jean-Denis 2005). Les teneurs des autres stilbènes, surtout celle des oligomères, qui constituent les tissus ligneux de *V. vinifera* ne sont pas connues. L'objectif de ce chapitre est d'identifier les stilbènes des sarments de *V. vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon et de les quantifier. Les sarments sont un modèle d'étude intéressant des tissus ligneux car leur prélèvement est aisé puisqu'ils sont taillés chaque année et de manière non destructive pour la plante. Au contraire le prélèvement d'échantillons de cep est plus complexe et altère définitivement la plante. De plus, les sarments font partie des organes où peuvent se développer certains agents de maladies du bois comme *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* (Troccoli *et al.* 2001, Bruno & Sparapano 2007 a).

Par des méthodes de LC-NMR et de LC-MS, nous avons identifié les stilbènes majoritaires des sarments de *V. vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon, ainsi que deux autres polyphénols ((+)-catéchine, (-)-épicatéchine). Ces données acquises, le dosage des polyphénols alors identifiés, a été possible.

## I. Caractérisation de polyphénols « constitutifs » des sarments de *V. vinifera*

Un extrait de sarments de Cabernet-Sauvignon a été réalisé en suivant le protocole de Zga *et al.* (2009), décrit dans le chapitre 2 (Matériels et Méthodes). Cet extrait est d'abord analysé par LC-NMR afin d'identifier les principaux polyphénols, en particulier les stilbènes, qui composent les sarments. Puis l'identification a été confirmée par LC-MS.

### I.1. Caractérisation des polyphénols par LC-NMR

Depuis plusieurs années, le GESVAB consacre une partie de son activité à l'identification des polyphénols dans les sarments. Une banque de spectres  $^1\text{H}$  de nombreux polyphénols de la vigne est disponible au laboratoire et permet par comparaison d'identifier rapidement les composés phénoliques d'un nouvel extrait. Le couplage de la chromatographie liquide à la spectroscopie de résonance magnétique, permet d'étudier des mélanges complexes sans fractionnement préalable. L'expérience acquise au laboratoire sur les polyphénols et la mise en œuvre de la LC-NMR ont facilité l'identification des composés majoritaires de l'extrait de Cabernet-Sauvignon étudié ici.

Dans l'extrait de Cabernet-Sauvignon, 9 molécules ont été identifiées : la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine, l'ampélopsine A, le *trans*-picéatannol, le *trans*-resvératrol, l'hopéaphénol, l'isohopéaphénol, l' $\epsilon$ -viniférine et la vitisine B. Les données des spectres  $^1\text{H}$  de chaque composé sont présentées dans les Tableaux IX à XVIII et les structures des composés ont déjà été présentées Figure 12.

**Tableau IX** : Données RMN  $^1\text{H}$  de la (+)-catéchine dans l'acétonitrile *d*-3.

	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult., <i>J</i> en Hz)
<b>2</b>	4.68 (1H, <i>m</i> )
<b>3</b>	4.13 (1H, <i>m</i> )
<b>4</b>	2.45 (1H, dd, 16.5, 8.0) 2.77 (1H, dd, 16.5, 5.7)
<b>6</b>	5.91 (1H, <i>d</i> , 1.9)
<b>8</b>	5.99 (1H, <i>d</i> , 1.9)
<b>2'</b>	6.83 (1H, <i>d</i> , 1.8)
<b>5'</b>	6.82 (1H, <i>d</i> , 7.8)
<b>6'</b>	6.75 (1H, dd, 7.8, 1.8)

**Tableau X** : Données RMN  $^1\text{H}$  de la (-)-épicatéchine dans l'acétonitrile *d*-3.

	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult., <i>J</i> en Hz)
<b>2</b>	4.88 (1H, <i>brs</i> )
<b>3</b>	4.22 (1H, <i>brs</i> )
<b>4</b>	2.64 (1H, dd, 16.5, 1.8) 2.82 (1H, dd, 16.5, 4.5)
<b>6</b>	5.97 (1H, <i>brs</i> )
<b>8</b>	5.99 (1H, <i>brs</i> )
<b>2',6'</b>	6.83 (1H, <i>brs</i> )
<b>4'</b>	6.93 (1H, <i>brs</i> )

**Tableau XI** : Données RMN  $^1\text{H}$  du *trans*-resvératrol dans l'acétonitrile *d*-3.

	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult., J en Hz)
<b>2, 6</b>	7.39 (2H, <i>d</i> , 8.5)
<b>3, 5</b>	6.79 (2H, <i>d</i> , 8.5)
<b>7</b>	6.85 (1H, <i>d</i> , 16.4)
<b>8</b>	7.02 (1H, <i>d</i> , 16.4)
<b>10, 14</b>	6.47 (2H, <i>d</i> , 1.8)
<b>12</b>	6.16 (1H, <i>t</i> , 1.8)

**Tableau XII** : Données RMN  $^1\text{H}$  du *trans*-picéatannol dans l'acétonitrile *d*-3.

	$\delta_{\text{H}}$ (int, mult., J en Hz)
<b>2</b>	7.03 (1H, <i>brs</i> )
<b>5</b>	6.80 (1H, <i>brd</i> , 9.0)
<b>6</b>	6.92 (1H, <i>di</i> , 9.0)
<b>7</b>	6.83 (1H, <i>d</i> , 16.4)
<b>8</b>	6.97 (1H, <i>d</i> , 16.4)
<b>10, 14</b>	6.52 (2H, <i>brs</i> )
<b>12</b>	6.11 (1H, <i>brs</i> )

**Tableau XIII** : Données RMN  $^1\text{H}$  de l' $\epsilon$ -viniférine dans l'acétonitrile  $d$ -3.

$n^\circ$	$\delta_{\text{H}}$ (int ; <i>mult.</i> ; <i>J</i> en Hz)	$n^\circ$	$\delta_{\text{H}}$ (int ; <i>mult.</i> ; <i>J</i> en Hz)
1a	-	1b	-
2a/6a	7.16 (2H, <i>d</i> , 8.7)	2b/6b	7.14 (2H, <i>d</i> , 8.7)
3a/5a	6.79 (2H, <i>d</i> , 8.7)	3b/5b	6.71 (2H, <i>d</i> , 8.7)
4a	-	4b	-
7a	5.41 (1H, <i>d</i> , 6.6)	7b	6.90 (1H, <i>d</i> , 16.3)
8a	4.48 (1H, <i>d</i> , 6.6)	8b	6.63 (1H, <i>d</i> , 16.3)
9a	-	9b	-
10a/14a	6.14 (2H, <i>d</i> , 2.2)	10b	-
11a/13a	-	11b	-
12a	6.12 (1H, <i>t</i> , 2.2)	12b	6.31 (1H, <i>d</i> , 2.2)
		13b	-
		14b	6.65 (1H, <i>d</i> , 2.2)

**Tableau XIV** : Données RMN  $^1\text{H}$  de l'ampélopsine A dans l'acétonitrile  $d$ -3.

$n^\circ$	$\delta_{\text{H}}$ (int ; <i>mult.</i> ; <i>J</i> en Hz)	$n^\circ$	$\delta_{\text{H}}$ (int ; <i>mult.</i> ; <i>J</i> en Hz)
2a/6a	7.04 (2H, <i>d</i> ; 8.4)	2b/6b	6.78 (2H, <i>d</i> , 8.4)
3a/5a	6.75 (2H, <i>d</i> , 8.4)	3b/5b	6.59 (2H, <i>d</i> , 8.4)
7a	5.78 (1H, <i>d</i> , 11.3)	7b	5.43 (1H, <i>d</i> , 4.7)
8a	3.95 (1H, <i>d</i> , 11.3)	8b	5.24 (1H, <i>d</i> , 4.7)
12a	6.32 (1H, <i>brs</i> )	12b	6.19 (1H, <i>brs</i> )
14a	6.13 (1H, <i>brs</i> )	14b	6.52 (1H, <i>brs</i> )

**Tableau XV** : Données RMN  $^1\text{H}$  du (+)-hopéaphénol dans l'acétonitrile  $d$ -3.

$n^\circ$	$\delta_{\text{H}}$ (int ; <i>mult.</i> ; <i>J</i> en Hz)	$n^\circ$	$\delta_{\text{H}}$ (int ; <i>mult.</i> ; <i>J</i> en Hz)
2a/6a	7.08 (2H, <i>d</i> , 8.4)	2b/6b	6.80 (2H, <i>d</i> , 8.4)
3a/5a	6.75 (2H, <i>d</i> , 8.4)	3b/5b	6.57 (2H, <i>d</i> , 8.4)
7a	5.74 (1H, <i>d</i> , 12.1)	7b	5.72 (1H, <i>brs</i> )
8a	4.08 (1H, <i>d</i> , 12.1)	8b	3.76 (1H, <i>brs</i> )
12a	6.39 (1H, <i>brs</i> )	12b	5.72 (1H, <i>brs</i> )
14a	6.20 (1H, <i>brs</i> )	14b	4.95 (1H, <i>brs</i> )

**Tableau XVI** : Données RMN  $^1\text{H}$  du (-)-isohopéaphénol dans l'acétonitrile  $d$ -3.

$n^\circ$	$\delta_{\text{H}}$ (int ; <i>mult.</i> ; <i>J</i> en Hz)	$n^\circ$	$\delta_{\text{H}}$ (int ; <i>mult.</i> ; <i>J</i> en Hz)
2a/6a	7.49 (2H, <i>d</i> , 8.4)	2b/6b	6.33 (2H, <i>d</i> , 8.4)
3a/5a	6.98 (2H, <i>d</i> , 8.4)	3b/5b	6.25 (2H, <i>d</i> , 8.4)
7a	5.54 (1H, <i>d</i> , 10.5)	7b	4.80 (1H, <i>brs</i> )
8a	5.30 (1H, <i>d</i> , 10.5)	8b	3.26 (1H, <i>brs</i> )
12a	6.25 (1H, <i>brs</i> )	12b	5.83 (1H, <i>brs</i> )
14a	6.04 (1H, <i>brs</i> )	14b	5.34 (1H, <i>brs</i> )

**Tableau XVII** : Données RMN  $^1\text{H}$  de la vitisine B dans l'acétone.

$n^\circ$	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>mult</i> ; <i>J</i> en Hz)	$n^\circ$	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>mult</i> ; <i>J</i> en Hz)
2a/6a	7.21 ( <i>d</i> , 8.6)	2c/6c	6.61 ( <i>brd</i> )
3a/5a	6.84 ( <i>d</i> , 8.5)	3c/5c	6.61 ( <i>brd</i> )
7a	5.42 ( <i>d</i> , 4.9)	7c	5.54 ( <i>d</i> , 4.8)
8a	4.55 ( <i>d</i> , 4.9)	8c	4.33 ( <i>d</i> , 4.8)
10a/14a	6.13( <i>d</i> , 2.1)	12c	6.32 ( <i>d</i> , 2.1)
12a	6.25 ( <i>t</i> , 2.1)	14c	6.68 ( <i>d</i> , 2.1)
2b	6.86 ( <i>brd</i> )	2d/6d	7.27 ( <i>d</i> , 8.6)
5b	6.81 ( <i>d</i> , 8.2)	3d/5d	6.93 ( <i>d</i> , 8.6)
7b	6.78 ( <i>d</i> , 16.3)	7d	5.42 ( <i>d</i> , 5.4)
8b	6.65 ( <i>d</i> , 16.3)	8d	4.47 ( <i>d</i> , 5.4)
12b	6.32 ( <i>d</i> , 2.1)	10d/14d	6.21 ( <i>brd</i> )
14b	6.20 ( <i>d</i> , 2.1)	12d	6.22 ( <i>brt</i> )

## I.2. Caractérisation des polyphénols par LC-MS

Le même extrait a ensuite été analysé par LC-MS. Comme pour la RMN, une banque de nombreux polyphénols de vigne a été créée qui permet l'identification de polyphénols déjà connus dans des extraits nouveaux. L'étude par spectrométrie de masse a confirmé l'identité des neufs composés reconnus en LC-NMR. La LC-MS a également permis d'identifier deux autres composés présents en trop faible quantité pour avoir pu être caractérisés en LC-NMR : le *trans*-picéide et le miyabénol C dont la structure a déjà été présentée dans la Figure 12. Le Tableau XIX précise les masses exactes et expérimentales, (m/z), des 11 polyphénols et indique les (m/z) des principaux fragments obtenus en MS<sup>2</sup>.

**Tableau XVIII :** Principaux composés phénoliques identifiés dans les sarments de *V. vinifera* par le système HPLC-ESI-IT (electrospray, trappe à ions). (Ces composés ont été identifiés par comparaison avec des standards).

Nom	Formule	m/z exacte	m/z ESI-IT [M+H <sup>+</sup> ]	m/z des fragments MS <sup>2</sup>
(+)-catéchine	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290,079038	290,941	272,9 ; 164,9 ; 150,9 ; 147 ; 139 ; 123,1
(-)-épicatéchine	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	290,079038	291,042	272,9 ; 164,9 ; 150,9 ; 147 ; 139 ; 123
ampélopsine A	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	470,136553	471,63	453,2 ; 359,1 ; 347,1 ; 243
<i>trans</i> -picéatannol	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	244,073559	244,4	226,7 ; 215,5 ; 197,5 ; 157,5 ; 135 ; 107,1
<i>trans</i> -resvératrol	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	228,078644	229,7	211,5 ; 183,5 ; 165,6 ; 153,5 ; 135,6 ; 141,7
hopéaphénol	C <sub>56</sub> H <sub>42</sub> O <sub>12</sub>	906,267627	907,62	812,9 ; 801 ; 719 ; 706,9 ; 453 ; 359,8
isohopéaphénol	C <sub>56</sub> H <sub>42</sub> O <sub>12</sub>	906,267627	907,22	812,8 ; 718,8 ; 706,8 ; 454,9 ; 452,9 ; 358,8
ε-viniférine	C <sub>28</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	454,141638	455,6	455,6 ; 437,3 ; 409,5 ; 361,4 ; 349,4 ; 343,4 ; 289,5
miyabénol C	C <sub>42</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>	680,204633	681,466	587 ; 575 ; 557 ; 481 ; 441 ; 345
vitisine B	C <sub>56</sub> H <sub>42</sub> O <sub>12</sub>	906,267627	907	812,8 ; 782,8 ; 650,9 ; 558,9 ; 540,9 ; 446,9

## I.3. Dosage des composés phénoliques identifiés

Les composés identifiés, exceptés l'ampélopsine A et le miyabénol C, ont été dosés dans les sarments issus de 3 céps de Cabernet-Sauvignon (Collection INRA). Les gammes étalon ont été élaborées à partir de composés purifiés au GESVAB. Les résultats sont présentés dans le Tableau XIX.

**Tableau XIX** : Teneurs en polyphénols dans les sarments de Cabernet-Sauvignon.

Polyphénol	Teneurs ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF) $\pm$ écart-type
(+)-catéchine	478 $\pm$ 25
(-)-épicatéchine	229 $\pm$ 27
<i>trans</i> -picéide	27 $\pm$ 1,7
<i>trans</i> -picéatannol	223 $\pm$ 0,2
<i>trans</i> -resvératrol	581 $\pm$ 8
$\epsilon$ -viniférine	372 $\pm$ 11
vitisine B	179 $\pm$ 39
hopéaphénol	161 $\pm$ 34
isohopéaphénol	342 $\pm$ 65

Les trois composés les plus abondants sont le *trans*-resvératrol, la (+)-catéchine, et l' $\epsilon$ -viniférine. Viennent ensuite l'isohopéaphénol, la (-)-épicatéchine, le *trans*-picéatannol, la vitisine B et l'isohopéaphénol. Le *trans*-picéide est très minoritaire par rapport aux autres molécules.

## II. Discussion

L'objectif de ce chapitre était d'identifier les polyphénols et en particulier les stilbènes majoritaires dans les sarments de *V. vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon. Après avoir identifiés les molécules, nous avons déterminé leur concentration chez ce même cépage. Cela nous donne un point de repère pour le prochain chapitre qui traitera de l'effet inhibiteur des composés phénoliques sur la croissance des agents pathogènes impliqués dans les maladies du bois. En effet, nous aurons besoin de comparer les concentrations des molécules dans le test *in vitro*, à leurs concentrations *in planta*.

Grâce à la LC-NMR et à la LC-MS, 11 composés phénoliques ont été identifiés : la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine, et 9 stilbènes dont 3 monomères : le *trans*-resvératrol, le *trans*-picéide et le *trans*-picéatannol ; 2 dimères : l'ampélopsine A et l' $\epsilon$ -viniférine ; 1 trimère, le miyabénol C et 3 tétramères : l'hopéaphénol, l'isohopéaphénol et la vitisine B.

Le stilbène le plus étudié dans les sarments est de loin le *trans*-resvératrol (Langcake 1976, Delaunay *et al.* 2002, Pussä 2006, Jean-Denis 2005). Les teneurs en resvératrol rapportées

dans la littérature oscillent entre 28 (Pinot noir) à 700  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF (Müller-Thurgau) pour les cépages de *V. vinifera* (Langcake & Pryce 1976, Jean-Denis 2005) et peuvent dépasser les 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF chez des hybrides (Püssa *et al.* 2006). Notre dosage du *trans*-resvératrol dans les sarments de Cabernet- Sauvignon donne une moyenne de 581  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF, dans le même ordre de grandeur que celui avancé dans la littérature pour d'autres cépages.

L' $\epsilon$ -viniférine a également déjà été quantifiée dans les sarments de *V. vinifera*. Les concentrations relevées varient entre 500 et 1023  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF (Roubelakis-Angelakis 2001, Jean-Denis 2005). Par exemple la concentration du dimère est de 943  $\mu\text{g}/\text{g}$  MF chez le Pinot noir. Lors de notre dosage nous avons estimé la concentration de cette molécule à 372  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF pour le Cabernet-Sauvignon, cette teneur est un peu faible mais reste tout à fait dans l'ordre de grandeur des quantités citées précédemment pour d'autres cépages.

Les autres stilbènes n'ont jamais été quantifiés de manière absolue et on peut grâce aux rendements des extractions donnés dans certaines publications, estimer la quantité de ces composés. D'après la publication de Zga *et al.* (2009), en faisant le rapport picéatannol pur obtenu / masse de sarment extraite), la concentration du *trans*-picéatannol dans les sarments de chardonnay peut être estimée à environ de 150  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF. Nous trouvons le *trans*-picéatannol à 223  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF dans les sarments de Cabernet-Sauvignon. Une de fois de plus ces valeurs restent du même ordre. Toujours d'après les travaux de Zga *et al.*, les teneurs en vitisine B peuvent être estimées à 10  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF. Avec des teneurs de l'ordre de 179  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF, la valeur que nous avons déterminée est 15 à 20 fois au dessus de cette estimation. Cependant, nous ne comparons pas les mêmes cépages et le chiffre de 10  $\mu\text{g}$  ne reste qu'une estimation obtenue par le rapport de la quantité de produit pur obtenu sur la masse de sarment extraite au départ. Enfin, concernant le *trans*-picéide, très minoritaire et l'hopéaphénol et l'isohopéaphénol identifiés chez *V. vinifera* cv. Kyohou (Yan *et al.* 2001), aucune information sur leurs teneurs dans les sarments n'est disponible.

La (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine ont également été quantifiées dans les sarments par d'autres auteurs. Les teneurs en (-)-épicatéchine, dans les sarments de cépages hybrides, varient entre 342 et 743  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF et celles de la (+)-catéchine entre 343 et 800  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF (Püssa 2006). Avec une concentration dans les sarments du Cabernet-Sauvignon, de l'ordre de 229  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF pour la (-)-épicatéchine et 478  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF pour la (+)-catéchine et bien que la comparaison ne porte pas sur des plantes de la même espèce, les valeurs sont très proches.

*Ce sont 11 polyphénols dont 9 stilbènes qui ont été identifiés par LC-NMR et LC-MS : la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine, le trans-picéide, le trans-picéatannol, le trans-resvératrol, l' $\epsilon$ -viniférine l'ampélopsine A, le miyabénol C, l'hopéaphénol, l'isohopéaphénol et la vitisine B. Le dosage de ces composés phénoliques dans les sarments de Cabernet-Sauvignon a montré que nos résultats sont cohérents avec ceux rapportés dans la littérature pour les composés qui avaient déjà été quantifiés dans les sarments. A notre connaissance, c'est la première fois que le trans-picéide, le trans-picéatannol, la vitisine B, l'hopéaphénol et l'isohopéaphénol aient été quantifiés précisément dans les sarments de V. vinifera.*



# CHAPITRE 4 : Effet des polyphénols sur les agents de maladies du bois

---

Les agents de maladie du bois, que ce soit ceux de l'esca ou de l'eutypiose, se développent dans le tronc mais également dans les sarments (Troccoli *et al.* 2001 ; Bruno & Sparapano 2007 a) et potentiellement dans les racines (Del Rio *et al.* 2001). Ces organes sont riches en composés phénoliques susceptibles de moduler la progression des champignons. En effet, les polyphénols sont connus depuis plusieurs décennies pour leur activité antimicrobienne (Link 1929).

L'activité antifongique de nombreux acides phénols, de la (+)-catéchine, du resvératrol et du ptérostilbène a déjà été testée sur des agents pathogènes mis en cause dans l'esca ou l'eutypiose (Chapuis 1995 ; Mugnai *et al.* 1999 ; Mazullo *et al.* 2000 ; Coutos-Thévenot *et al.* 2001 ; Del Rio *et al.* 2004 ; Bruno & Sparapano 2006c ; Sanstos *et al.* 2006). Ces essais *in vitro* ont permis de montrer un effet, le plus souvent inhibiteur, de ces composés.

Bien que parmi les polyphénols, les stilbènes sont reconnus comme les composés antifongiques les plus actifs de la vigne, peu d'entre eux ont été testés dans ce type d'essai : le resvératrol (Mazullo *et al.* 2000, Santos *et al.* 2006, Bruno & Sparapano 2007, Coutos-Thévenot *et al.* 2001) le ptérostilbène (Mazullo *et al.* 2000), l' $\epsilon$ - et la  $\delta$ -viniférine (Djoukeng *et al.* 2009). Si le resvératrol et l' $\epsilon$ -viniférine sont des composés majoritaires des tissus ligneux, il ne semble pas que le ptérostilbène et la  $\delta$ -viniférine, identifiés dans les feuilles, y soient retrouvés. Pourtant de nombreux autres stilbènes ont été identifiés dans les tissus ligneux de *V. vinifera* comme le picéatannol (Zga *et al.* 2009), le miyabénol C (Barjot *et al.* 2007) et la vitisine A (Yan *et al.* 2001).

Au delà de la démonstration de l'activité antifongique des polyphénols, peu d'études se sont attachées à comparer à la fois plusieurs classes de ces composés et plusieurs espèces de champignons impliqués dans les maladies du bois. Enfin, le lien entre concentrations inhibitrices d'une molécule et sa propre concentration *in planta* est rarement fait de même que des synergies potentielles ne sont pas recherchées.

L'objectif de ce chapitre est donc d'étudier l'effet inhibiteur des composés phénoliques sur la croissance mycélienne, en tenant compte des observations précédentes et en se basant sur des essais *in vitro*. Ces résultats devraient apporter de nouveaux éléments, notamment sur l'activité des oligomères de resvératrol qui composent les tissus où se développent les agents de maladies du bois. En particulier, quelles sont les molécules les plus actives ? À quelle concentration ? Existe-t-il des synergies entre ces composés ?

Du point de vue des agents pathogènes, l'objectif est de déterminer la réponse de plusieurs champignons aux composés phénoliques. Ces résultats pourraient, par exemple, expliquer le caractère pionnier ou non des espèces qui se succèdent dans le syndrome de l'esca.

Pour ce travail, nous avons croisé les résultats d'essais d'inhibition de la croissance mycélienne, de dosages de polyphénols dans le milieu, de test de détection d'enzymes fongiques et de microscopie.

Ces résultats devraient nous permettre de mieux appréhender le rôle potentiel des polyphénols dans la défense de la vigne contre les agents de maladie du bois et de cibler les molécules qui pourraient être impliquées dans ce mécanisme pour la suite de notre étude.

## **I. Effet de composés phénoliques de la vigne sur la croissance mycélienne**

Une étude bibliographique et les connaissances acquises au GESVAB sur les stilbènes de la vigne nous a permis de sélectionner 24 composés phénoliques présents dans les tissus ligneux de la vigne et/ou dans ses racines. Seul le ptérostilbène n'a jamais été identifié dans ces tissus. Ce composé est le stilbène de la vigne présentant la plus forte activité antifongique (Langcake 1981, Pezet & Pont 1990) et il sera ici un étalon pour comparer l'activité des autres molécules.

**Tableau XX** : Comparaison des concentrations de nos molécules dans le milieu du test antifongique (conversion 500  $\mu\text{M}$  en  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  milieu) et des concentrations de ces molécules dans les **sarments de *V. vinifera*** lorsqu'elles sont connues. Les cases grisées correspondent aux molécules qui ont été testées à des concentrations plus fortes *in vitro* par rapport à celles *in planta*.

	Concentration des composés phénoliques dans nos essais antifongiques ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ milieu)	Concentration dans les sarments de Cabernet-Sauvignon ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF)	Concentrations relevées dans la littérature ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF)	Références et observations
<i>trans</i> -resvératrol	107	581	28-700	(Langcake 1976 Müller-Thurgau, Jean-Denis 2005 Chasselas)
<i>trans</i> -picéide	183	27	-	
<i>trans</i> -picéatannol	119	223	-	Identifié dans les sarments (Zga 2009 Chardonnay)
<i>trans</i> -ptérostilbène	120	-	-	Non identifié dans les sarments mais activité antifongique forte (Langcake 1981)
ampélopsine A	220	-	-	Identifié dans les sarments (Jean-Denis 2005, Chasselas)
$\varepsilon$ -viniférine	213	372	500-1023	(Bavaresco 2001 <i>V. vinifera</i> , Jean-Denis 2005 Chasselas)
miyabérol C	318	-	-	Identifié dans les sarments (Barjot 2007 <i>V. vinifera</i> )
vitisine A	425	-	-	Identifié dans les tiges de Kyohou (Yan 2001)
vitisine B	425	179	-	Identifié dans les sarments de (Zga 2009 Chardonnay, Bisson 2011 Merlot)
hopéaphénol	425	161	-	Identifié dans les tiges de Kyohou (Yan 2001)
isohopéaphénol	425	342	-	Identifié dans les tiges de Kyohou (Yan 2001)
kaempférol	135	-	-	Traces de kaempferol glucoside dans les rafles de Merlot (Souquet 2000)
quercétine	141	-	-	Quercétine glucoside 18 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ; Quercétine glucuronide 20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dans les rafles de Merlot (Souquet 2000)
catéchine	136	478	342-800	(Pussä 2006, cépages hybrides) Identifié dans les sarments de <i>V. vinifera</i> (Luque-Rodriguez 2006)
épicatéchine	136	229	342-742	(Pussä 2006, cépages hybrides)
épicatéchine-gallate	207	-	-	Identifié dans les sarments de Merlot (GESVAB)
ac. chlorogénique	166	-	-	Identifié dans l'écorce <i>V. vinifera</i> (Kliwer 1966)
ac. sinapique	105	-	-	Identifié dans les sarments <i>V. vinifera</i> (Luque-Rodriguez 2006)
ac. syringique	93	-	113	(Luque-Rodriguez 2006, <i>V. vinifera</i> )
ac. gallique	80	-	508	(Luque-Rodriguez 2006, sarments <i>V. vinifera</i> )
ac. caféique	84	-	-	Identifié dans l'écorce <i>V. vinifera</i> (Kliwer 1966)
ac. coumarique	77	-	-	Identifié dans les sarments <i>V. vinifera</i> (Luque-Rodriguez 2006)
ac. férulique	91	-	32	(Luque-Rodriguez 2006, sarments <i>V. vinifera</i> )
ac. vanillique	79	-	96	(Luque-Rodriguez 2006, sarments <i>V. vinifera</i> )

Les composés phénoliques qui ont été testés sont : 11 stilbènes, 8 acides phénols, 2 flavonols et 3 flavan-3-ols, présentés Figure 12. Chacun de ces composés a été testé sur 6 agents de maladie du bois (*P. chlamydospora*, *F. mediterranea*, *P. aleophilum*, *D. seriata* F99-1 et *N. parvum* Bp0014) au cours d'essais *in vitro* sur milieu gélosé, à la concentration de 500  $\mu\text{M}$  pour réaliser le criblage.

La concentration de 500  $\mu\text{M}$  utilisée pour le criblage a été définie par rapport aux concentrations inhibitrices rapportées dans la littérature, entre 40 et 900  $\mu\text{M}$  (Bruno & Sparapano 2006c, Santos *et al.* 2006, Mugnai *et al.* 1999, Mazullo *et al.* 2000) et qui sont en adéquation avec les teneurs en polyphénols dans les sarments (Pussä *et al.* 2006, Roubelakis-Angelakis 2001, Luque-Rodriguez *et al.* 2006). Le Tableau XX met en parallèle la concentration des molécules lors des essais antifongiques avec les teneurs des polyphénols dans les sarments. La concentration des molécules dans le milieu des essais antifongique, 500  $\mu\text{M}$ , est exprimée en  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de milieu. Les concentrations des polyphénols dans les sarments sont celles estimées dans le chapitre 1 et rapportées dans la littérature. Lorsque les concentrations des composés phénoliques dans les sarments sont inconnues, des précisions sont apportées quant à leur identification ou leurs teneurs dans d'autres organes.

Les composés pour lesquels aucune information n'est disponible sur leurs teneurs dans les sarments sont : l'ampélopsine A, le miyabénol C, la vitisine A, le kaempférol, la quercétine et les acides chlorogénique, sinapique, caféique, et *p*-coumarique.

Pour les 12 autres molécules pour lesquelles les concentrations dans les sarments sont connues, quatre sont utilisées dans les tests *in vitro* à des concentrations supérieures à celles *in planta* : le picéide (x 6,8), la vitisine B (x 2,4), l'isohopéaphénol (x 2,6) et l'acide férulique (x2,8). Toutefois, les concentrations que nous avons relevées ultérieurement (Chapitre 6, étude de la parcelle « esca ») ont montré que la vitisine B et l'hopéaphénol peuvent être en quantité bien supérieures dans les sarments à celles mesurées dans le chapitre 1. De l'ordre de 626 à 884  $\mu\text{g.g}^{-1}$  MF pour la vitisine B et de 794 à 1045  $\mu\text{g.g}^{-1}$  MF pour l'isohopéaphénol et ces valeurs sont 1,5 à 2,5 fois plus fortes que dans nos essais. La vitisine B est aussi présente dans les racines à des concentrations élevées (de l'ordre de 2700  $\mu\text{g.g}^{-1}$  MS, résultats non montrés). Or, *P. chlamydospora* et *P. aleophilum* seraient capables de se développer dans les racines (Del Rio *et al.* 2001). En revanche, quelles qu'aient été les conditions, les concentrations en picéide dans les sarments ont toujours été inférieures à celle utilisée dans le milieu des essais antifongiques. Quant à l'acide férulique, ne disposant d'aucune autre

information sur ces teneurs que celles apportées par Luque-Rodriguez *et al.* (2006), on ne peut que considérer qu'il a été testé *in vitro* à une concentration supérieure à celle qui est la sienne dans les sarments.

## I.1. Criblage des 24 composés phénoliques

Chacun des 24 composés phénoliques a été testé sur les 6 champignons de maladie du bois : *D. seriata* BoF99-1, *N. parvum* Bp0014, *E. lata*, *F. mediterranea*, *P. aleophilum* et *P. chlamydospora*. L'essai consiste à déposer un « plug » calibré de mycélium sur le milieu gélosé supplémenté ou non en composé phénolique à 500  $\mu$ M. La mesure du diamètre mycélien permet de calculer un pourcentage de croissance du champignon en présence de la molécule par rapport au contrôle. Le pH du milieu nutritif est de 5,0 et l'addition des composés phénoliques ne modifie pas cette valeur.

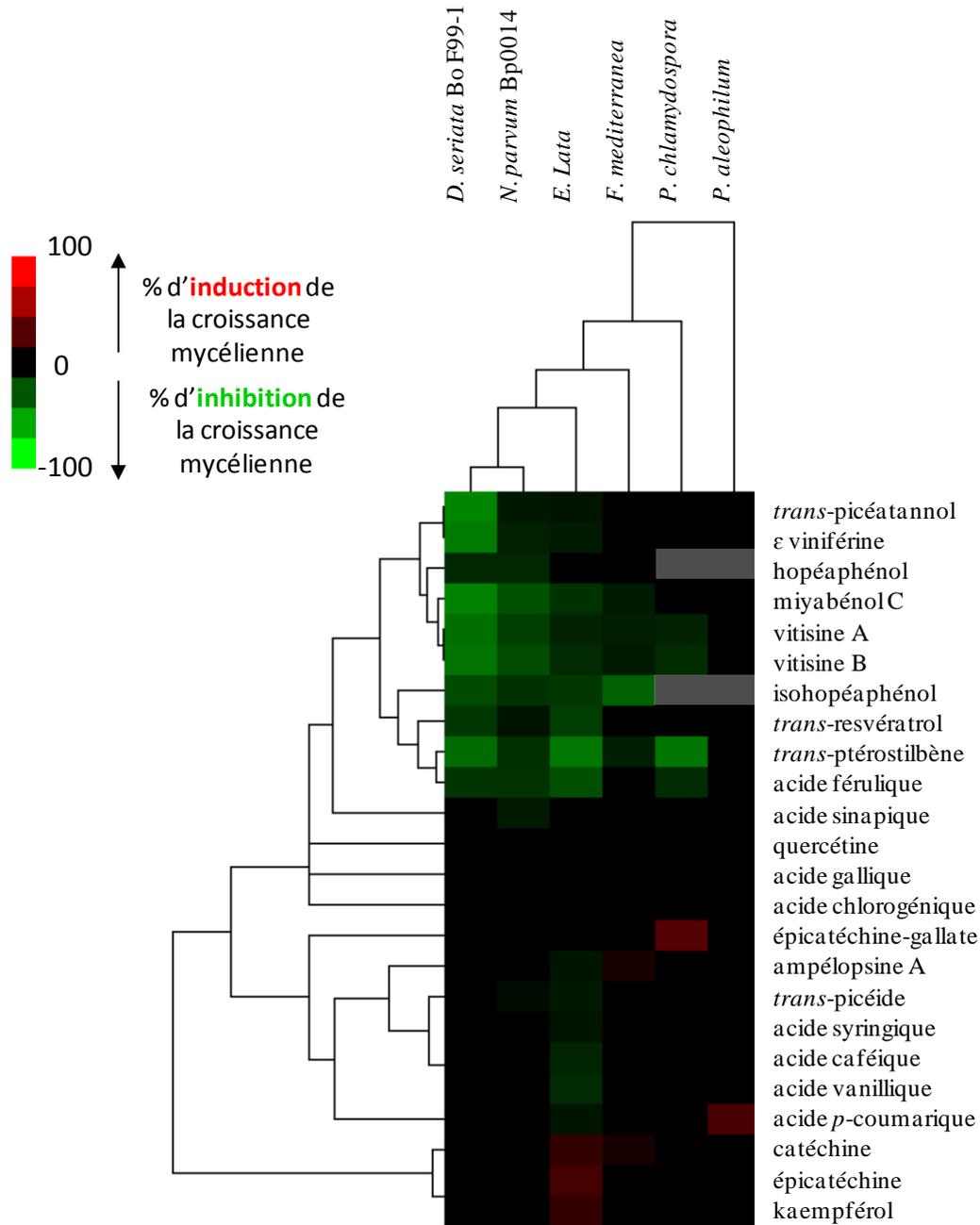
La Figure 14 et le Tableau XXI présentent les résultats de croissance mycélienne des 6 agents de maladie du bois en présence de chaque composé phénolique.

Parmi les composés testés, seuls les stilbènes et certains acides phénols montrent une activité inhibitrice de la croissance mycélienne. Les flavonols et flavan-3-ols n'ont pas d'effet sur les espèces testées voire stimulaient leur croissance dans quelques cas.

Le cluster (Figure 14) distingue un premier groupe de 8 molécules exerçant un effet inhibiteur important : 7 stilbènes et un acide phénol, l'acide férulique. Le ptérostilbène, notre composé de référence, est particulièrement actif : il est capable d'inhiber la croissance de 5 des 6 espèces testées de l'ordre de 21 à 82%. Les vitisines A et B, deux tétramères de resvératrol sont les seules autres molécules montrant le même spectre d'activité que le ptérostilbène. Vient ensuite le miyabénol C, un trimère, capable d'inhiber la croissance de 4 espèces des 6 testées, de l'ordre de 19 à 90%. L'isohopéaphénol, un tétramère, n'a pu être testé que sur 4 des 6 champignons, sur lesquels il exerce une activité inhibitrice. Au contraire de plusieurs autres polyphénols, le champignon le plus affecté par l'isohopéaphénol est *F. mediterranea* (67% d'inhibition). L' $\epsilon$ -viniférine et le picéatannol, quant à eux, inhibent la croissance de 3 agents pathogènes entre 19 et 92%. Le resvératrol inhibe également la croissance de ces champignons mais dans des proportions moindres.

**Tableau XXI :** Pourcentage de croissance des différents agents de maladie du bois en présence des 24 composés phénoliques. Les chiffres dont la case est colorée représentent les valeurs significativement différentes du contrôle au seuil  $\alpha = 5\%$  (test de Mann Whitney). La coloration verte est utilisée pour une inhibition de la croissance mycélienne par rapport au contrôle, tandis que la coloration rouge indique une induction de la croissance mycélienne par rapport au contrôle. Les cases grises correspondent à des tests non réalisés. (*Ds*, *Diplodia seriata* BoF99-1 ; *Np*, *Neofusicoccum parvum* Bp0014 ; *El*, *Eutypa lata* ; *Fm*, *Fomitiporia mediterranea* ; *Pal*, *Phaeoacremonium aleophilum* ; *Pch*, *Phaeoconiella chlamydospora*)

Famille de molécule	Molécule	Pourcentage de croissance par rapport au contrôle					
		<i>Ds</i>	<i>Np</i>	<i>El</i>	<i>Fm</i>	<i>Pal</i>	<i>Pch</i>
Stilbènes	resvératrol	-38	-14	-43	3	-14	-14
	picéide	2	-9	-17	0	9	-2
	picéatannol	-92	-17	-14	9	-8	0
	ptérostilbène	-74	-33	-82	-21	-15	-81
	ampélopsine	12	-6	-15	17	39	18
	$\epsilon$ -viniférine	-85	-22	-19	-3	39	-24
	miyabénol C	-90	-57	-35	-19	33	3
	vitisine A	-77	-44	-24	-22	34	-24
	vitisine B	-80	-52	-30	-18	35	-30
	hopéaphénol	-27	-27	0	-3		
	isohopéaphénol	-52	-34	-39	-67		
Flavonols	kaempférol	6	-8	36	1	3	15
	quercétine	-14	-6	5	-8	-14	-3
Flavan-3-ols	catéchine	-2	1	48	2	0	32
	épicatéchine	18	1	36	116	9	51
	épicatéchine-gallate	-6	9	24	14	-6	58
Acides phénols	ac. chlorogénique	4	-7	-1	-7	-11	1
	ac. sinapique	-5	-17	-2	6	-12	-5
	ac. syringique	2	4	-14	-3	11	-10
	ac. gallique	-1	-1	-9	-6	-13	-7
	ac. caféique	-3	-3	-24	8	11	-5
	ac. coumarique	-5	-5	-15	4	50	3
	ac. férulique	-36	-35	-55	-4	16	-29
	ac. vanillique	7	-2	-29	0	-11	-7



**Figure 14 :** Présentation sous forme de cluster hiérarchique des pourcentages de croissance mycélienne des 6 champignons testés en présence de chaque polyphénol. Plus la coloration est rouge, plus la molécule induit la croissance. Plus la coloration est verte plus la molécule inhibe la croissance. Une coloration noire signifie qu'aucun effet de la molécule n'a été observé. Les cases grisées correspondent à des tests non réalisés.

L'hopéaphénol est le tétramère le moins actif de notre essai.

Le picéide et l'ampélopsine ne sont pas regroupés avec les autres stilbènes. Dans cette famille, ils sont les moins aptes à réduire la croissance mycélienne. L'ampélopsine induit même la croissance de *F. mediterranea*.

L'acide férulique est l'acide phénol qui a montré l'activité inhibitrice la plus importante en diminuant la croissance de quatre des champignons testés de l'ordre de 19 à 55%. Les acides sinapique, syringique, caféique, coumarique et vanillique sont également capables de réduire légèrement la croissance d'*E. lata* ou *N. parvum*.

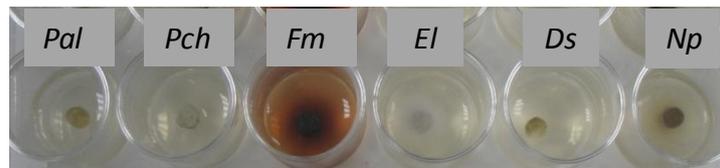
Les flavonols et les flavan-3-ols testés ne présentaient aucune activité inhibitrice et même ont amplifié la croissance de certains champignons, à l'exception de la quercétine.

Du point de vue des différents agents pathogènes testés, on peut distinguer trois groupes. Le premier réunit les espèces les plus sensibles aux composés phénoliques : *D. seriata*, *N. parvum* et *E. lata*. Si *E. lata* est l'espèce dont la croissance peut être inhibée par le plus grand nombre de composés (plus de la moitié des molécules testées), *D. seriata* est le champignon pour lequel les plus fortes inhibitions sont enregistrées (92% au plus). Pour ces trois champignons, il a été possible de déterminer des CI50 inférieures à 500µM en évaluant leur croissance en présence de picéatannol, d' $\epsilon$ -viniférine ou de ptérostilbène à 50, 100, 250 et 500 µM (Tableau XXII). Le deuxième groupe comprend *F. mediterranea* et *P. chlamydospora* qui sont moyennement sensibles et à seulement quatre composés phénoliques. Le troisième groupe correspond à *P. aleophilum*, totalement insensible à tous les composés à l'exception de l'acide *p*-coumarique qui accroît son développement.

**Tableau XXII :** CI50 de *Diplodia seriata* BoF99-1, *Neofusicoccum parvum* Bp0014 et *Eutypa lata* exprimée en µM. Les résultats représentent la moyenne de trois répétitions indépendantes.

Molécule	<i>D. seriata</i> BoF99-1	<i>N. parvum</i> Bp0014	<i>E. lata</i>
picéatannol	299	>500	>500
$\epsilon$ viniférine	260	>500	>500
ptérostilbène	163	250	251

Une recherche de la présence polyphénol oxydases dans le milieu de culture des 6 espèces fongiques, a été réalisée avec comme substrat, le guaiacol. Les résultats sont présentés Figure 15. La coloration rouge caractéristique de la présence de ces enzymes n'est apparue que dans le cas de *F. mediterranea*.

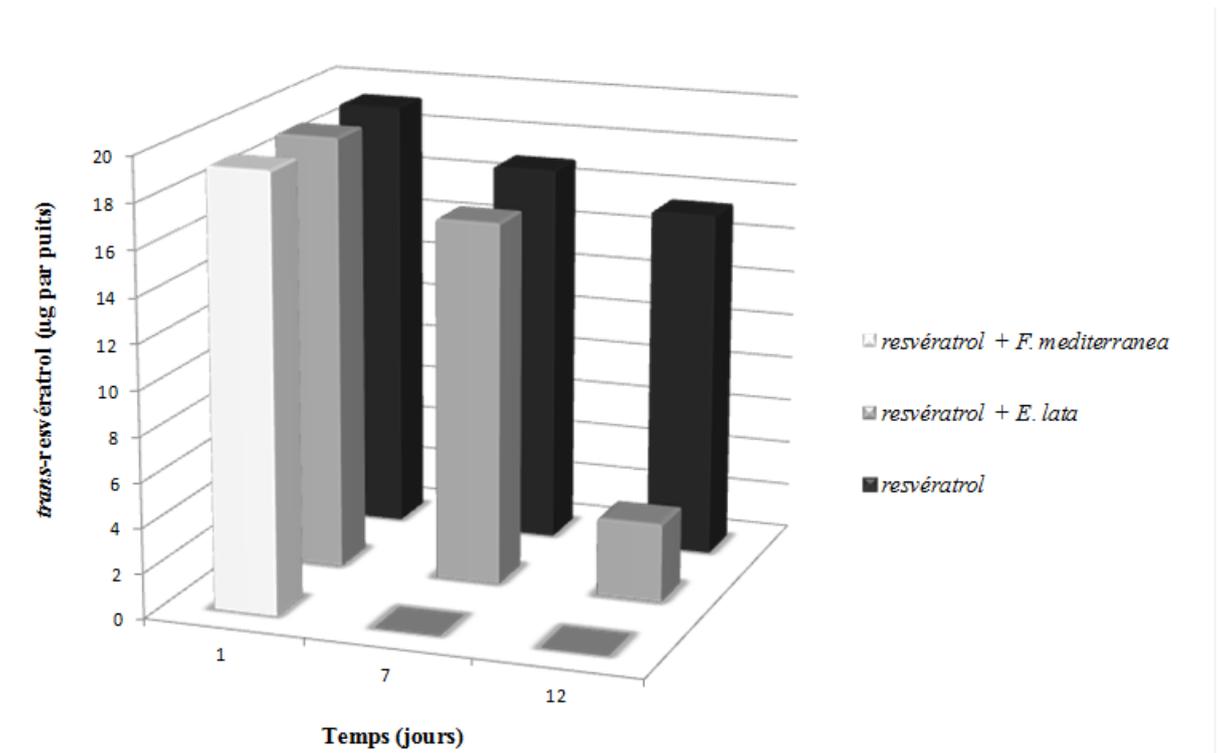


**Figure 15 :** Photographie illustrant l'essai de détection de polyphénol oxydases. Les espèces suivantes ont été testées : *Phaeoacremonium aleophilum* (Pal), *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), *Fomitiporia mediterranea* (Fm), *Eutypa lata* (El), *Diplodia seriata* Bo F99-1(Ds) et *Neofusicoccum parvum* Bp 0014 (Np).

La vitesse de croissance de *F. mediterranea*, *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* est lente et les mesures de diamètre de leur mycélium ont été effectuées 8 à 12 jours après l'ensemencement des puits au lieu de 2 à 3 jours pour les autres espèces testées. Ces champignons sont aussi peu sensibles aux stilbènes. Nous souhaitions savoir si après 10 jours, la quantité de stilbène dans le milieu reste significative ou si leur teneur diminue fortement ce qui pourrait expliquer que ces trois champignons ne soient pas affectés. La persistance de notre stilbène de référence, le resvératrol, a été suivie afin de déterminer la quantité de molécules restantes après 7 et 12 jours dans le milieu. Les résultats sont présentés Figure 16. Il existe une dégradation passive du resvératrol dans le milieu gélosé. Après 12 jours la perte en resvératrol est estimée à 20%. Cette diminution semble faible et l'insensibilité de *F. mediterranea*, *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* au resvératrol n'est sans doute pas liée à la dégradation « naturelle » de ce produit dans le milieu.

Ce suivi a été réalisé en présence de *F. mediterranea* qui n'est pas sensible au resvératrol et produit des polyphénol oxydases et en présence de *E. lata*, qui est le plus sensible au resvératrol et qui ne produit pas a priori de telles enzymes. L'objectif de cette comparaison est de vérifier si *F. mediterranea* est capable de détoxifier le resvératrol et d'autre part qu'un champignon sensible comme *E. lata* n'a pas cette possibilité. Dès 7 jours, il ne reste plus de resvératrol dans le milieu de *F. mediterranea* ce qui est en accord avec la détection de polyphénol oxydase chez ce champignon. En revanche à 7 jours, plus de 80% du resvératrol

perdure dans le milieu de *E. lata* et il faut attendre le 12<sup>ème</sup> jour pour voir diminuer fortement les quantités du monomère.



**Figure 16 :** Quantification du resvératrol dans le milieu gélosé au cours du temps. Trois conditions sont testées : resvératrol 500 µM, resvératrol 500 µM en présence d'*E. lata* et resvératrol 500 µM en présence de *F. mediterranea*. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes de trois répétitions chacune.

## I.2. Détermination de synergie entre polyphénols

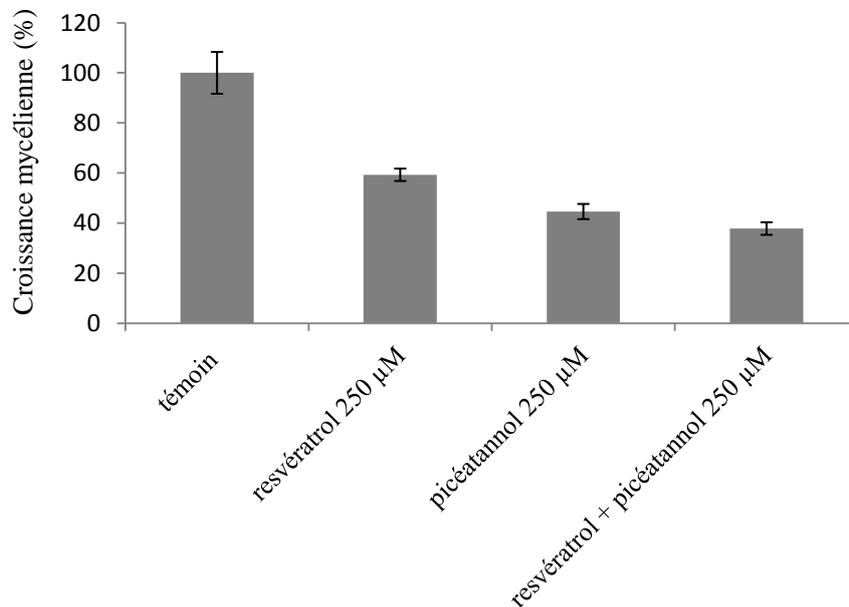
Les polyphénols se trouvent en mélange dans les tissus végétaux et il est possible que l'activité d'un composé donné puisse être modulée par la présence d'autres molécules. Afin de se rapprocher un peu plus des conditions réelles *in planta*, des essais ont été réalisés en additionnant deux polyphénols dans le milieu. Ainsi 4 couples de molécules identifiées dans les tissus ligneux de la vigne ont été testés :

- resvératrol et (+)-catéchine
- resvératrol et (-)-épicatéchine
- catéchine et épicatéchine
- resvératrol et picéatannol

Notre objectif était notamment de savoir si des synergies ou des antagonismes existent entre ces polyphénols. La synergie est ici définie par l'obtention d'une meilleure inhibition lorsque les deux molécules sont réunies que lorsqu'elles agissent séparément. Au contraire, un antagonisme correspondrait à l'obtention d'une inhibition plus faible lorsque les deux molécules sont réunies que lorsqu'elles agissent séparément.

Aucun antagonisme n'a été démontré. Lorsque les deux molécules sont combinées, la valeur de l'inhibition de la croissance mycélienne est le plus souvent égale à celle de la molécule ayant le pouvoir inhibiteur le plus fort ou se situe dans une valeur intermédiaire entre celles données par les deux composés séparément (résultats non montrés).

Un seul cas de synergie a été identifié entre le resvératrol et le picéatannol et uniquement dans le cas de *D. seriata* Bo F99-1 (Figure 17). Le resvératrol à 250  $\mu\text{M}$  inhibe la croissance de ce champignon de 41% et le picéatannol, à la même concentration, de 55%. La combinaison des deux composés, chacun à 250  $\mu\text{M}$ , permettent de réduire légèrement plus et de manière significative, la croissance mycélienne de *D. seriata* Bo F99-1 à 62 %.



**Figure 17 :** Évaluation de la croissance mycélienne de *D. seriata* Bo F99-1 sur milieu gélosé supplémenté en resvératrol à 250  $\mu\text{M}$  ou en picéatannol à 250  $\mu\text{M}$  ou par un mélange des deux composés, chacun à 250  $\mu\text{M}$ . Les résultats sont ceux d'une des trois expériences indépendantes ayant abouti aux mêmes conclusions. Les résultats sont exprimés en pourcentage de croissance par rapport au contrôle (100%) et représentent la moyenne  $\pm$  écart-type de trois répétitions.

### I.3. Discussion

Les composés phénoliques sont connus pour leur activité antifongique en particulier sur les agents responsables des maladies du bois de la vigne (Amborabé *et al.* 2002, Bruno & Sparapano 2007a, Chapuis 1995, Coutos-Thévenot *et al.* 2001, Del Rio *et al.* 2004, Djoukeng *et al.* 2009, Mazullo *et al.* 2000, Mugnai *et al.* 1999, Santos *et al.* 2006). Nous avons confirmé ces travaux précédents et démontré l'activité inhibitrice d'autres polyphénols : 17 des 24 composés testés sont actifs sur divers champignons. Les quelques divergences que nous avons observé avec la littérature sont potentiellement dues à des différences de concentration. Par exemple, Del Rio *et al.* (2004) ont démontré précédemment que l'acide *p*-coumarique inhibe la croissance de *P. chlamydospora* de l'ordre de 50%, à la concentration de 3 g.l<sup>-1</sup>. Dans nos conditions, la concentration de l'acide *p*-coumarique était de 0,082 g.l<sup>-1</sup>, soit près de 40 fois moins. Il est probable que cette différence de concentration explique l'absence d'inhibition dans nos essais. Dans le cas du resvératrol, quelques contradictions existent entre des travaux antérieurs et nos résultats, qui ne peuvent être imputées à des différences de concentration. Par exemple, Mazullo *et al.* (2006) ont démontré que *E. lata* n'est pas inhibé par le resvératrol qu'il soit à 2200 ou 4400 µM alors que nous démontrons une inhibition de 43% à 500 µM de resvératrol en accord les travaux de Coutos-Thévenot *et al.* (2001). Cette différence pourrait être expliquée par le fait que des souches différentes de *E. lata* ont été utilisées. En effet il est connu qu'au sein de l'espèce *E. lata*, il existe une variabilité d'agressivité des souches (Laveau *et al.* 2009) qui pourrait se traduire par une sensibilité différente aux polyphénols. D'autres paramètres pourraient aussi expliquer ces différences de résultats : une variation du pH (Amborabé *et al.* 2002), l'absence ou la présence d'une source de carbone autre que le composé phénolique, comme le glucose contenu dans le milieu PDA (Bruno & Sparapano 2006c).

Nous avons testé un large panel de stilbènes, du monomère au tétramère. Cette famille de polyphénols est de loin, la plus active en terme d'inhibition de la croissance mycélienne. Les molécules les plus actives sont les tétramères (vitisine A et vitisine B), puis le trimère miyabénol C, viennent ensuite le dimère  $\epsilon$ -viniférine et le monomère picéatannol, et enfin le dimère ampélopsine A et le monomère glycosylé picéide.

D'un point de vue relation structure/activité, quelques remarques peuvent être faites. Tout d'abord, il semble que plus le degré d'oligomérisation est élevé, plus la molécule inhibe la croissance mycélienne. Deux exceptions ont été relevées cependant dans notre essai pour

l'ampélopsine et l'hopéaphénol. La comparaison de l'activité antimicrobienne des stilbènes présentant des degrés d'oligomérisation différents n'a pas été étudiée précédemment. Néanmoins, une augmentation de l'activité avec le nombre d'unités resvératrol a été observée dans le cadre de test d'inhibition d'un transporteur membranaire humain (Bobrowska-Hägerstrand *et al.* 2006), de test de cytotoxicité sur des cellules tumorales (Ito *et al.* 2003) et de test d'inhibition de la production d'oxyde nitrique dans des cellules microgliales (Nassra *et al.* 2011). Par ailleurs, comme cela avait été déjà démontré, nous confirmons que la présence des groupements OCH<sub>3</sub> du ptérostilbène sont à l'origine de la forte activité de cette molécule tandis que le glucose sur le cycle A du picéide diminue son activité. Il est plus difficile d'interpréter la faible activité de l'ampélopsine A. Néanmoins, Yim *et al.* (2010) rapportait déjà que son activité antibactérienne vis-à-vis de streptocoques oraux est quatre à seize fois inférieure à celle du resvératrol, du picéatannol et de l' $\epsilon$ -viniférine. La comparaison de l'activité de l'hopéaphénol et de l'isohopéaphénol, le second étant bien plus actif que le premier, montre l'importance de l'isomérisation (stéréoisomères).

Nous avons testé nos composés à une concentration analogue ou jusqu'à six fois inférieure à celle observée dans le bois d'une vigne saine. Au niveau des zones de réaction induites par les champignons lignivores dans le bois (Shain 1979), une accumulation forte et localisée de composés phénoliques est observée. Ainsi, la concentration des composés phénoliques y est sûrement plus élevée. Par exemple, les teneurs en resvératrol sont multipliées par 2 dans le bois de vigne infecté par *P. chlamydospora* par rapport au bois sain (Martin *et al.* 2009). Aussi, il est fort probable que les molécules actives dans nos essais, exercent réellement une activité antifongique dans la plante. Une exception, l'acide férulique a été testé à des concentrations 2,8 fois supérieures à celles relevées *in planta* (Tableau XX).

Les acides phénols ont également montré des aptitudes à réduire la croissance mycélienne, notamment l'acide férulique. Ce composé était testé pour la première fois contre les agents de maladie du bois, bien que son activité antifongique a été rapportée par Tawata *et al.* (1996) contre l'oomycète *Pythium sp.* Néanmoins, ce composé ayant été testé à de fortes concentrations par rapport à celles *in planta*, il n'est pas possible de conclure que ce composé puisse être actif dans la plante.

Que ce soit les flavonols ou les flavan-3-ols, aucun d'entre eux n'a pu diminuer la croissance mycélienne. Dans le cas des flavonols il est important de signaler qu'à 20% d'éthanol, la quercétine et le kaempférol sont insolubles ce qui perturbe potentiellement l'évaluation de

leur activité. Pour les flavan-3-ols, les tests en milieu gélosé semblent impropres à démontrer leur possible activité antifongique (Witzell & Martín 2008). Il est probable que leur rôle défensif soit placé à un autre niveau qu'une activité fongicide directe. En effet, la catéchine et l'épicatéchine-gallate sont des inhibiteurs potentiels de stilbènes oxydase de *B. cinerea* (Goetz 1999). Les polyphénols étant des antioxydants ils pourraient également agir au niveau cellulaire sur les processus oxydatifs (Witzell & Martín 2008), essentiels lors d'une attaque par un agent pathogène.

La recherche de synergie entre composés phénoliques n'a pas apporté de résultats probants. Seule une faible synergie a été identifiée entre le picéatannol et le resvératrol et uniquement pour *D. seriata* alors qu'aucune tendance similaire n'apparaît pour les autres champignons. Soit chaque molécule agit de manière autonome soit le modèle *in vitro* qui a été mis en œuvre atteint ses limites et n'est pas apte à démontrer des synergies. En outre, ces résultats confirment qu'il est important de considérer chaque couple molécule-champignon car il donne un résultat spécifique.

Plusieurs composés phénoliques ont induit la croissance de certains champignons. Cette induction de croissance a déjà été observée par d'autres auteurs (Chapuis 1995, Mazullo *et al.* 2000) sans pouvoir être réellement expliquée. Dans notre cas, cet effet n'est probablement pas dû à une utilisation des composés phénoliques comme nouvelle source de carbone car ils sont en infime quantité au regard de l'extrait de malt et de pomme de terre présents dans le milieu. En revanche, l'hypothèse que les composés phénoliques puissent être reconnus par le champignon comme une « molécule signal » qui stimule son développement, ne peut pas être exclue. C'est une hypothèse qui a d'ailleurs été avancée dans le cas des mycorrhizes (Douds 1996).

Du point de vue des champignons, la réponse des six individus testés est propre à chacun et dépend de la molécule. Néanmoins deux groupes se distinguaient dans nos essais : d'un côté *P. chlamydospora*, *P. aleophilum* et *F. mediterranea* sont peu sensibles aux composés phénoliques et de l'autre *E. lata*, *N. parvum* et *D. seriata* sont particulièrement affectés.

*P. chlamydospora*, *P. aleophilum* et *F. mediterranea* sont considérés comme les champignons pionniers de l'esca : ils permettraient de détoxifier les tissus et favoriseraient le développement d'autres champignons dans leur sillage. La tolérance de ces trois espèces aux polyphénols, que nous avons observée, est donc en accord avec leur caractère pionnier. L'identification de polyphénol oxydases dans le milieu de *F. mediterranea* en accord avec les

résultats antérieurs de Mugnai *et al.* (1999) et la disparition totale du resvératrol dans son milieu de culture à 7 jours après inoculation, renforcent l'idée que ce champignon est capable de dégrader les polyphénols. Cette dégradation pourrait être réalisée par des polyphénol oxydases, mais ces enzymes n'ont pas été identifiées dans le milieu de *P. chlamydospora* et *P. aleophilum* par le test guaïacol. Selon Mugnai *et al.* (1999) seules quelques souches de ces deux espèces produisent des peroxydases et il est possible que les souches que nous avons étudiées ne produisent pas ces enzymes. Leur insensibilité aux polyphénols pourrait s'expliquer par d'autres mécanismes que la détoxification enzymatique. Par exemple, la résistance d'oomycètes du genre *Pythium* ou *Phytophthora* a été reliée à une déficience en stérols de leur membrane plasmique (Morrissey & Osbourn 1999).

La croissance de *E. lata*, *N. parvum* et *D. seriata* était particulièrement restreinte par les composés phénoliques. Il est connu que la croissance des Botryosphaeriaceae est inhibée par des saponines et des extraits végétaux contenant des coumarines et des alcaloïdes (Mazet *et al.* 2010 ; Barros *et al.* 2011). En revanche, leur réponse, en terme de croissance, à des composés phénoliques purs et autres que les coumarines a été peu étudiée. La seule référence trouvée rapporte que le resvératrol, l' $\epsilon$ - et la  $\delta$ -viniférine n'inhibent pas la croissance de *D. seriata* (Djoukeng *et al.* 2009). La deuxième partie de ce chapitre sera donc consacrée à une étude des Botryosphaeriaceae afin de déterminer si la sensibilité des deux souches que nous avons étudiée est un caractère partagé ou non par d'autres membres de cette famille.

Si ces essais *in vitro* simples et rapides, ont l'avantage majeur d'étudier l'effet de chaque composé en utilisant une faible quantité de molécules, nous n'oublions pas qu'ils ne sont qu'un système artificiel parfois en contradiction avec les résultats d'essais ayant pour substrat le bois (Hart & Shrimpton 1979). Aussi dans les chapitres suivants, nous nous intéresserons plus particulièrement aux polyphénols *in planta*.

***En résumé, les stilbènes sont les molécules les plus aptes à inhiber, in vitro, la croissance des agents responsables des maladies du bois. Les oligomères semblent particulièrement efficaces et sont des cibles potentielles pour l'étude des réponses de la vigne aux maladies du bois. L'acide férulique est la seule autre molécule parmi celles étudiées, à présenter une activité similaire aux stilbènes. Les champignons pionniers de l'esca sont plus tolérants aux polyphénols tandis que les Botryosphaeriaceae sont apparemment très sensibles à ces molécules.***

## II. Etude de la famille des Botryosphaeriaceae

### II.1. Sensibilité de différentes espèces aux polyphénols

Au vu des résultats obtenus lors du criblage des 22 composés phénoliques, nous nous sommes intéressés de plus près aux Botryosphaeriaceae. En effet, les deux espèces testées se sont avérées particulièrement sensibles aux polyphénols.

Afin de vérifier si ce caractère est partagé par d'autres membres de cette famille, huit souches supplémentaires ont été sélectionnées (Tableau V). Leur croissance a été évaluée en présence de 5 molécules parmi les plus actives : le resvératrol, le picéatannol, le ptérostilbène, l' $\epsilon$ -viniférine et l'acide férulique à 500  $\mu$ M (Tableau XXIII) avec le même type d'essai mis en œuvre pour le criblage des 22 composés phénoliques. Les CI50 inférieures à 500  $\mu$ M ont été déterminées en testant les concentrations suivantes : 50, 100, 250 et 500  $\mu$ M (Tableau XXIV).

La croissance de la plupart des Botryosphaeriaceae a été inhibée par les composés phénoliques testés : seules trois des 50 conditions testées (5 molécules et 10 champignons) n'ont pas démontré d'inhibition de la croissance mycélienne. L'inhibition du développement mycélien est parfois totale, comme dans le cas de *D. mutila* en présence de ptérostilbène ou de picéatannol.

Les deux tableaux montrent que les souches d'une même espèce ont des comportements très semblables. Par exemple, les souches *D. seriata* sont plus sensibles aux polyphénols que les deux souches *N. parvum*. Un comportement similaire est également noté entre des espèces différentes, comme entre *L. theobromae* et les souches *D. seriata*. Sur la base de ces observations nous avons établi un cluster hiérarchique, à partir des valeurs de croissance des dix Botryosphaeriaceae en présence de resvératrol, de picéatannol, de ptérostilbène, d' $\epsilon$ -viniférine et d'acide férulique à 500  $\mu$ M.

**Tableau XXIII :** Effet de 5 composés phénoliques (500  $\mu$ M) sur la croissance de 12 espèces fongiques de la famille des Botryosphaeriaceae. Les résultats sont présentés en pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du champignon en présence d'un composé phénolique par rapport à sa croissance sur le milieu contrôle (0% d'inhibition). *ns* signifie non significatif en accord avec les résultats du test de Mann Whitney au risque  $\alpha = 5\%$ .

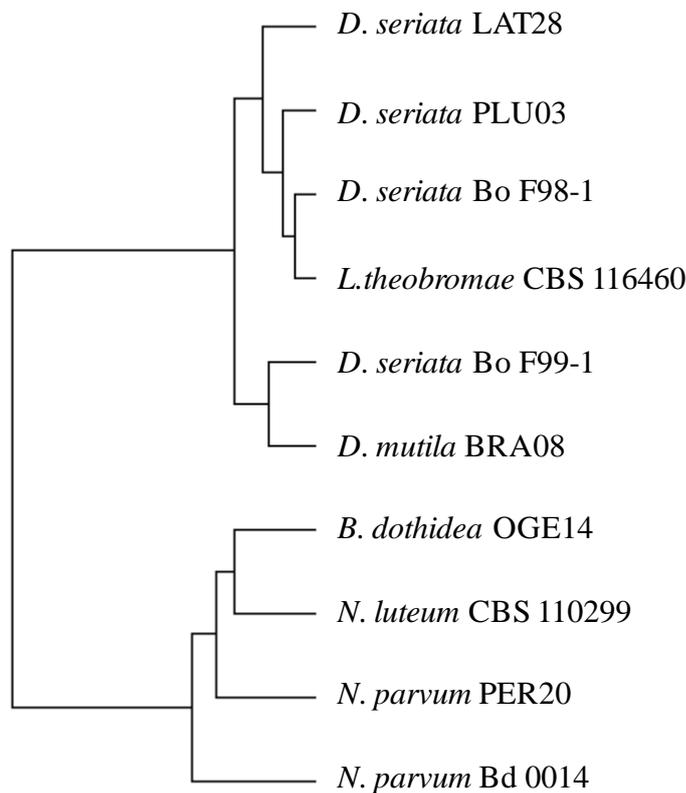
	<i>L. theobromae</i> CBS 116460	<i>N. luteum</i> CBS 110 299	<i>D. mutila</i> BRA 08	<i>N. parvum</i> PER 20	<i>N. parvum</i> Bp 0014	<i>D. seriata</i> LAT 28	<i>D. seriata</i> Bo F99-1	<i>D. seriata</i> PLU 03	<i>D. seriata</i> Bo F98-1	<i>B. dothidea</i> OGE 14
<i>trans</i> -resvératrol	26	<i>ns</i>	37	24	14	37	38	46	26	<i>ns</i>
<i>trans</i> -picéatannol	68	59	100	62	17	89	92	71	66	38
<i>trans</i> -ptérostilbène	61	16	100	19	33	74	74	95	85	34
$\epsilon$ -viniférine	63	37	88	25	22	54	85	72	73	40
acide férulique	36	23	51	23	35	36	36	24	32	<i>ns</i>

**Tableau XXIV :** CI50 ( $\mu$ M) du *trans*-resvératrol, *trans*-picéatannol, *trans*-ptérostilbène et de l' $\epsilon$ -viniférine sur la croissance mycélienne de 8 champignons de la famille des Botryosphaeriaceae. (-) signifie valeur non déterminée car la CI50 est supérieure à 500  $\mu$ M.

	<i>L. theobromae</i> CBS 116460	<i>N. luteum</i> CBS 110 299	<i>N. parvum</i> PER 20	<i>N. parvum</i> Bp 0014	<i>D. seriata</i> LAT 28	<i>D. seriata</i> Bo F99-1	<i>D. seriata</i> PLU 03	<i>B. dothidea</i> OGE 14
<i>trans</i> -resvératrol	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -picéatannol	367	419	408	-	363	299	345	-
<i>trans</i> -ptérostilbène	354	-	-	-	250	163	103	-
$\epsilon$ -viniférine	408	-	-	-	351	260	225	-

La Figure 18 présente ce cluster que nous avons comparé à des arbres phylogénétiques de la famille des Botryosphaeriaceae (Pitt 2010). Dans notre cluster deux groupes se distinguent. Le premier réunit les 4 souches testées des espèces *D. seriata*, *L. theobromae* et *D. mutila*. Le second rapproche *B. dothidea*, *N. luteum* et les deux *N. parvum*. Cette ségrégation est identique à celle observée par Pitt (2010). Le premier nœud des arbres présentés par ces auteurs distinguent les espèces des genres *Fusicoccum* (*B. dothidea*) et *Neofusicoccum* (*N. luteum*, *N. parvum*), des espèces des genres *Lasiodiplodia* (*L. theobromae*) et *Diplodia* (*D. seriata*, *D. mutila*).

A l'intérieur de ces groupes, en revanche, la classification est hétérogène et ne permet pas d'interprétation.



**Figure 18 :** Cluster hiérarchique basé sur le pourcentage de croissance des différentes espèces de la famille des Botryosphaeriaceae en présence de resvératrol, picéatannol, ptérostilbène, ε-viniférine ou d'acide férulique à 500µM.

## II.2. Étude de l'impact du ptérostilbène sur la morphologie de *D. seriata*

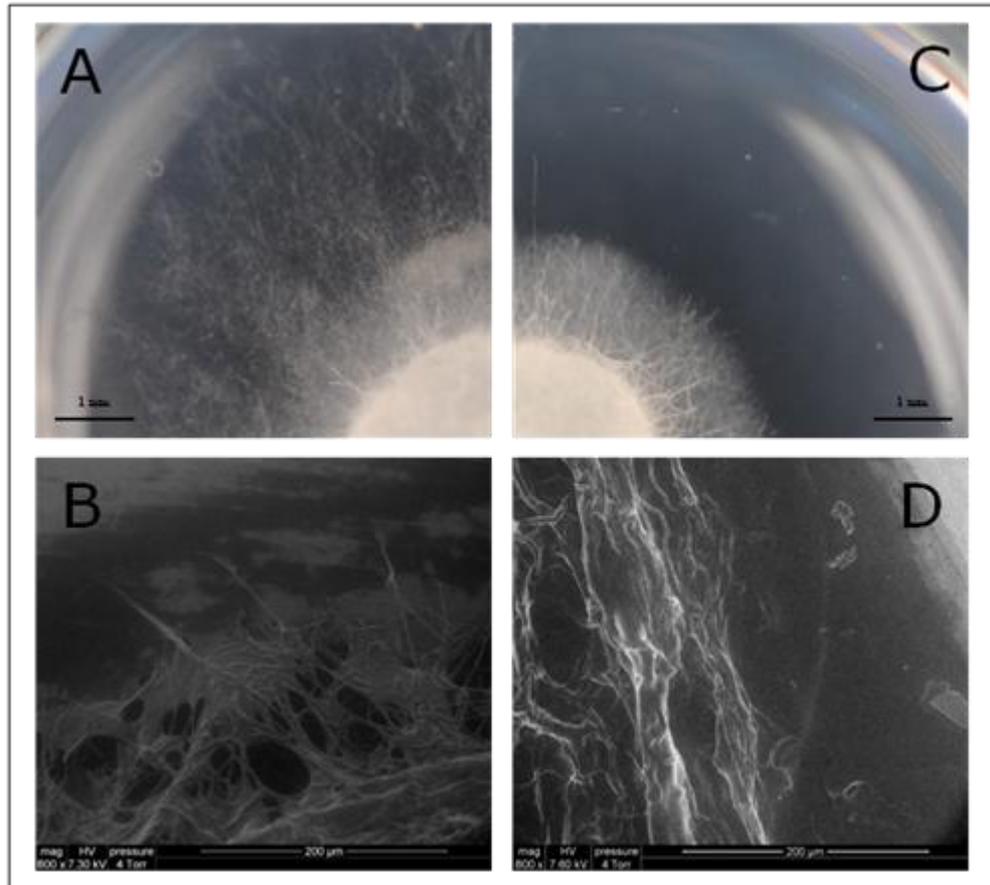
Les résultats présentés précédemment montrent que le Botryosphaeriaceae et en particulier l'espèce *D. seriata* est particulièrement sensible aux stilbènes. Notre objectif est de mieux comprendre l'impact de ces composés sur le champignon en vérifiant notamment si la présence de composé phénolique perturbe la morphologie du champignon.

Pour cela, une approche microscopique a été mise en place. Le mycélium de *D. seriata* BoF99-1 a été observé en microscopie électronique à balayage. Deux conditions ont été choisies : milieu contrôle ou additionné d'un des stilbènes les plus inhibiteurs de la croissance : le ptérostilbène à 500  $\mu$ M. La méthode utilisée, la microscopie électronique à balayage en conditions environnementales (ou ESEM), permet d'observer directement l'échantillon et de s'affranchir des artefacts liés à sa préparation.

La Figure 19 présente le mycélium de *D. seriata* observé à l'échelle macroscopique et microscopique. A l'échelle macroscopique, le mycélium en l'absence de ptérostilbène colonise toute la surface du milieu (A). En présence de ptérostilbène (C), le mycélium est dense et se développe à proximité de l'inoculum sans coloniser le reste d.

A l'échelle microscopique, le mycélium a été observé depuis le plug d'inoculum jusqu'à la zone de croissance active. Aucune différence n'a été observée au niveau du mycélium âgé que ce soit sur le milieu contrôle ou en présence de ptérostilbène.

Cependant au niveau de la zone de croissance active, si la morphologie des hyphes ne semble pas altérée, les observations confirment ce qui a été vu à l'échelle macroscopique. Le mycélium en présence de ptérostilbène semble être stoppé net alors que sur le milieu contrôle des hyphes « s'élancent » pour coloniser le milieu.



**Figure 19** : Observation de l'effet du ptérostilbène sur le mycélium de *D. seriata*. Les images représentent le mycélium vu à l'œil nu après deux jours de croissance sur le milieu contrôle (A) ou le milieu supplémenté en ptérostilbène à 500  $\mu\text{M}$  (C) ou observé en microscopie électronique à balayage au niveau de la zone de croissance active du mycélium sur le milieu contrôle (B) ou le milieu supplémenté en ptérostilbène à 500  $\mu\text{M}$  (D).

### II.3. Discussion

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons pu observer que la croissance de *D. seriata* Bo F99-1 et de *N. parvum* Bp 0014 est particulièrement affectée par les stilbènes. Dans cette seconde partie, l'objectif était de vérifier si ce caractère est un trait spécifique de la famille des Botryosphaeriaceae auxquels appartiennent ces deux espèces.

Nos résultats ont montré que les dix Botryosphaeriaceae testés sont sensibles aux polyphénols, à des degrés différents toutefois. La présentation des résultats des tests d'inhibition de croissance sous forme d'arbre nous a permis de voir que la réponse des champignons est liée à leur genre. Si la réponse d'un champignon à une molécule est

spécifique, il semble tout de même que des comportements similaires existent entre des espèces phylogénétiquement proches. Par exemple, les champignons du genre *Neofusicoccum* tolèrent mieux les stilbènes que les champignons du genre *Diplodia*. De manière intéressante, plusieurs études ont montré que les espèces du genre *Neofusicoccum* sont plus virulentes que les espèces du genre *Diplodia* (Laveau *et al.* 2009, Urbez-Torres *et al.* 2009) : cette variation pourrait s'expliquer par la capacité accrue des *Neofusicoccum* à se développer dans un environnement riche en polyphénols.

Enfin, l'étude microscopique de l'action du ptérostilbène sur la morphologie de *D. seriata* Bo F99-1 n'a pas montré d'effet de la molécule sur la structure des hyphes. Il est possible qu'à cette concentration le ptérostilbène ne perturbe pas ou peu le métabolisme du champignon. Une étude en microscopie électronique à transmission aurait peut être permis de détecter des modifications à l'échelle de la cellule. En effet, Pezet et Pont (1995) ont démontré que le ptérostilbène affecte la membrane plasmique et les organelles de conidies de *B. cinerea*.

***La deuxième partie de ce chapitre a permis de montrer que les Botryosphaeriaceae forment une famille particulièrement sensible à l'effet inhibiteur des composés phénoliques. Au sein de cette famille, des tendances de réponses aux composés phénoliques se dessinent en fonction du genre et qui correspondent aussi à des différences d'agressivité des souches. L'étude microscopique, comme les essais, tend à montrer que l'effet des composés phénoliques est uniquement fongistatique.***

### III. Conclusion

Les objectifs de ce chapitre étaient de déterminer quels composés phénoliques identifiés dans le bois de vigne ont l'activité antifongique la plus marquée et quelles différences existent entre les différents agents impliqués dans les maladies du bois. Les résultats obtenus apportent de nouvelles données, à la fois sur les stilbènes et aussi sur la famille des Botryosphaeriaceae.

Les stilbènes sont les molécules les plus aptes à inhiber la croissance des agents responsables des maladies du bois, *in vitro*. Si ce résultat pouvait être attendu, en revanche, il est nouveau d'observer que les oligomères de resvératrol sont particulièrement efficaces et que leur

activité semble augmenter avec le nombre d'unités resvératrol qui les composent. Ils feront partie des composés d'intérêt qui seront suivis *in planta* dans les chapitres suivants.

Les champignons pionniers de l'esca, *P. chlamydospora*, *P. aleophilum* et *F. mediterranea*, ont montré leur capacité à croître dans un milieu riche en polyphénol. Le caractère pionnier de ces champignons réside sûrement, en partie, dans leur tolérance à ces molécules. Dans le cas de *F. mediterranea*, cela a pu être relié à une détoxification des composés phénoliques par des polyphénol oxydases. Quelques stilbènes ont tout de même montré un effet inhibiteur sur *P. chlamydospora* et *F. mediterranea*. Or, les concentrations que nous avons utilisées sont inférieures à celles trouvées dans la plante et sans doute très inférieures aux concentrations des composés phénoliques dans les zones de réaction (zones de défense contre les champignons dans le bois). Un rôle de ces molécules dans la restriction du développement des champignons pionniers est donc probable.

La deuxième partie de ce chapitre a permis de montrer que les Botryosphaeriaceae forment une famille particulièrement sensible à l'effet inhibiteur des composés phénoliques. Au sein de cette famille, nous avons pu montrer que la tolérance ou la sensibilité aux composés phénoliques a tendance à caractériser les individus d'un même genre. D'ailleurs un parallèle a pu être établi entre la forte agressivité des souches du genre *Neofusicoccum* et leur moindre sensibilité aux polyphénols.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont établi que les stilbènes sont des molécules d'intérêt dans l'étude des réponses de défense de la vigne aux maladies du bois. Après avoir démontré l'activité inhibitrice de ces molécules sur les agents de maladie du bois, *in vitro*, nous allons chercher à savoir si, dans la plante, ce rôle se confirme. Les chapitres 4 et 5 se proposent de répondre à cette question et portent respectivement sur la détermination des polyphénols constitutifs et induits par l'esca dans les sarments et sur la réponse de la vigne à des agents de maladie du bois.

# CHAPITRE 5 : Réponses de défense de la vigne aux agents de maladies du bois

---

Dans les chapitres précédents, nous avons montré que les stilbènes majoritaires identifiés dans les sarments de la vigne inhibent fortement la croissance des champignons de maladies du bois *in vitro*. Par ailleurs, il est connu que, dans le cas de l'esca, les teneurs en polyphénols sont plus élevées dans le cep au niveau de la zone nécrosée brun-rouge (Larignon 1991, Agrelli *et al.* 2009), notamment celles du resvératrol et de l' $\epsilon$ -viniférine (Amalfitano *et al.* 2000), seules molécules identifiées. Un enrichissement en resvératrol et en  $\epsilon$ -viniférine a également été montré dans le bois de boutures inoculées par *P. chlamydospora* (Martin *et al.* 2009). Ces deux caractères, présence au sein du bois « malade » et activité antimicrobienne suggèrent l'implication des stilbènes dans les défenses induites. Il serait donc intéressant de déterminer quelles sont les molécules polyphénoliques induites, en plus du resvératrol et de l' $\epsilon$ -viniférine par la présence des agents de maladie du bois, notamment pour établir un parallèle avec les résultats du chapitre précédent. Plus précisément, notre objectif est de déterminer quels stilbènes, sont les plus fortement induits et si parmi ceux-ci sont retrouvés les oligomères, dont nous avons pu montrer la forte activité antimicrobienne.

Pour cela nous avons travaillé sur des boutures herbacées de Merlot (dit tolérant aux maladies du bois) inoculées au niveau de la partie ligneuse par deux agents de la famille des Botryosphaeriaceae : *D. seriata* et *N. parvum*. Les teneurs en stilbènes ont été quantifiées autour du site d'inoculation et comparées avec le développement des agents pathogènes.. Cette approche devrait permettre d'identifier précisément quels stilbènes sont produits suite au développement de l'agent pathogène dans le bois « malade » et si tel est le cas, si l'inoculation d'un autre agent pathogène, même si ceux-ci appartiennent à la même famille, entraîne une production différentielle qualitative et/ou quantitative de stilbènes.

Dans une seconde partie nous avons cherché à comparer plusieurs cépages. En effet, sur la base de la fréquence d'expression des symptômes foliaires, il a été établi que certains cépages sont plus tolérants que d'autres à l'esca et à l'eutypiose (Dubos 2002, Christen *et al.* 2007). Aucune explication biologique n'a jamais été apportée à ces variations de sensibilité. Néanmoins, il est couramment admis que les cépages dit tolérants posséderaient des systèmes de défense, par exemple la production de composés antimicrobiens, plus efficace que chez les cépages dits sensibles. Le syndrome de l'esca induit dans les feuilles symptomatiques, l'expression de gènes de défense (Letousey *et al.* 2010 ; Magnin-Robert *et al.* 2011) codant pour des enzymes de la voie de biosynthèse des stilbènes (*PAL*, *STS*), et des protéines PR (*Chi4C*, *Chit1b*), liées à la pathogenèse. Nous avons donc cherché à comparer cette induction de défense chez différents cépages dits sensibles ou tolérants. La stimulation de ces réactions de défense est potentiellement liée à la présence de composés éliciteurs et en particulier les toxines fongiques (Bruno & Sparapano 2007a, Andolfi *et al.* 2011). Nous avons choisi de reproduire ce phénomène en élicitant des boutures herbacées de différents cépages avec un filtrat de milieu de culture de *Phaeomoniella chlamydospora*. L'absorption de filtrat fongique par le xylème des boutures a pour objectif de mimer ce qui se passe *in planta* lorsqu'un champignon se développe au sein des tissus vasculaires de la plante : il sécrète des composés qui vont circuler *via* le xylème, comme les toxines (Bruno & Sparapano 2007a), et entraîner l'apparition de symptômes ainsi que l'induction de gènes liés à la défense au niveau foliaire (Letousey *et al.* 2010 ; Magnin-Robert *et al.* 2011 ; Luini *et al.* 2010). Cette méthode d'absorption devrait permettre d'éliciter les défenses végétales dans les feuilles et ainsi d'évaluer si ces défenses, particulièrement la production de stilbènes et l'expression de gènes liés à la défense, sont différentiellement exprimées selon la sensibilité du cépage.

## **I. Suivi de la synthèse des polyphénols inoculées par *D. seriata* et *N. parvum***

Le chapitre précédent a permis de montrer que les Botryosphaeriaceae forment une famille de champignons particulièrement sensibles aux polyphénols. Au sein de cette famille, nous avons pu noter que la croissance des souches *D. seriata* a été inhibée plus fortement que celle des souches *N. parvum*, connues pour être plus agressives (Laveau *et al.* 2009). Dans cette partie

nous comparerons l'évolution des teneurs en polyphénols dans le bois de boutures inoculées par *D. seriata* et par *N. parvum*.

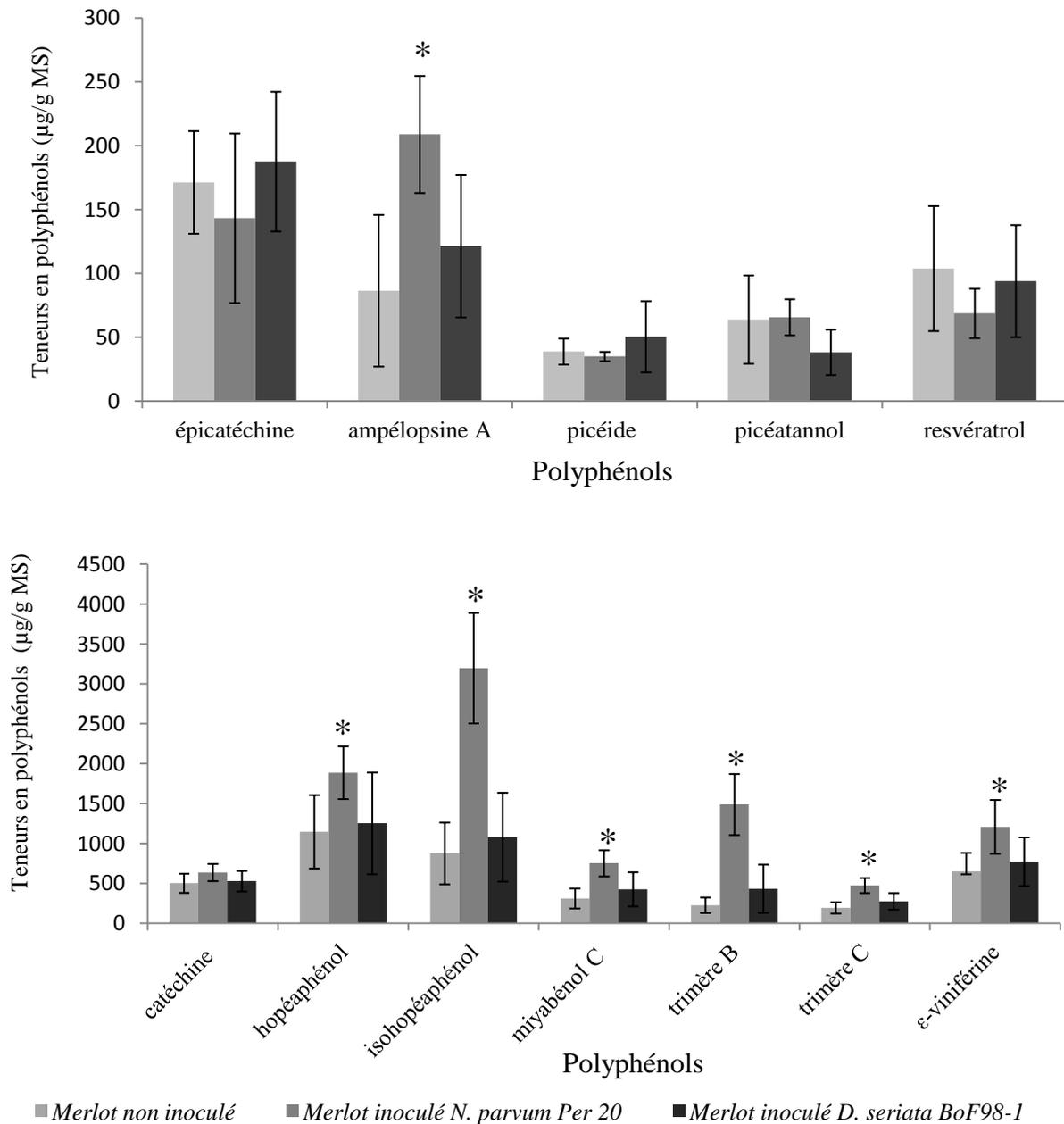
### I.1. Teneurs en polyphénols dans les boutures infectées par deux Botryosphaeriaceae

Des boutures foliaires de Merlot ont été inoculées par *D. seriata* BoF98-1 et *N. parvum* Per20. La Figure 20 montre des photographies de la partie ligneuse de boutures foliaires en coupe longitudinale. Au niveau de la bouture témoin, non inoculée, un très léger brunissement et circonscrit au pourtour de la zone percée apparaît (A). En revanche, une longue bande brune est bien visible de part et d'autre du site d'inoculation, sur les boutures foliaires infectées par *N. parvum* (B). Parmi les boutures infectées par *D. seriata* (C), aucune d'entre elles ne présente de nécrose nette, elles paraissent identiques au témoin.



**Figure 20** : Photographies de la partie ligneuse, en coupe longitudinale, des boutures de Merlot témoin (A), inoculées par *N. parvum* (B) et par *D. seriata* (C). Les flèches indiquent les sites d'inoculation, le contrôle ayant été simplement percé.

Le dosage des polyphénols a été effectué dans le bois nécrosé ou non et ces résultats sont présentés Figure 21. Aucune variation significative dans la teneur des polyphénols n'a pu être notée entre les boutures témoin et les boutures infectées par *D. seriata*.



**Figure 21 :** Teneurs des composés phénoliques dans le bois de boutures de Merlot non infectées ou inoculées par *D. seriata* BoF98-1 et dans le bois nécrosé de boutures inoculées par *N. parvum* Per 20. Les valeurs représentent la moyenne des valeurs établies sur 10 boutures  $\pm$  écartype. \* indique les valeurs significativement différentes des boutures non inoculées (ANOVA de Kruskal-Wallis, risque d'erreur de 5%).

En revanche, dans les tissus nécrosés des boutures inoculées par *N. parvum*, plusieurs stilbènes sont induits et ce sont tous des oligomères : deux dimères (l'ampélopsine A (2,7 fois) et l' $\epsilon$ -viniférine (1,9 fois)), trois trimères (le miyabénol C (2,4 fois) et deux trimères non identifiés mais détectés en LC-MS (trimère B, 6,6 fois et trimère C 2,5 fois)) et deux

tétramères (l'hopéaphénol (1,6 fois) et l'isohopéaphénol (3,7 fois). L'isohopéaphénol est le composé majoritaire des boutures inoculées par *N. parvum*. Aucune différence significative n'apparaît entre les boutures témoin et les boutures inoculées par *N. parvum* Per 20 pour le picéide, le picéatannol, le resvératrol, la catéchine et l'épicatéchine.

Par rapport aux oligomères de resvératrol, les monomères ne sont pas induits et sont présents en faible quantité dans le bois des boutures foliaires.

## I.2. Discussion

L'objectif de cette partie était d'identifier les stilbènes induits lors d'une infection par un agent de maladie du bois.

Nous avons montré que dans les boutures inoculées par *N. parvum* Per 20 plusieurs stilbènes, tous des oligomères, sont présents en quantité plus importante dans le bois nécrosé. Il s'agit de deux dimères l'ampélopsine A et l' $\epsilon$ -viniférine, de trois trimères, le miyabénol C et deux trimères non identifiés ainsi que de deux tétramères l'hopéaphénol, l'isohopéaphénol.

Ces résultats sont en accord avec des travaux menés sur des boutures inoculées par *P. chlamydospora* et *P. aleophilum*. Les zones de bois infecté de ces boutures s'enrichissent en polyphénols (Del Rio *et al.* 2001), plus particulièrement en resvératrol,  $\epsilon$ -viniférine, isohopéaphénol, hopéaphénol et en ampélopsine A (Martin *et al.* 2009 ; Amalfitano *et al.* 2011). Toutefois nous n'avons pas observé de modification des teneurs en resvératrol, ni des autres stilbènes monomériques, qui sont présents en faible quantité par rapport aux autres stilbènes.

Cependant aucune accumulation de stilbènes significative par rapport au témoin n'a été notée autour de la zone d'inoculation dans les boutures infectées par *D. seriata* BoF98-1. Martin *et al.* (2009) avaient déjà observé qu'en fonction des souches de *P. chlamydospora* inoculées, la stimulation de la synthèse des stilbènes n'est pas toujours produite.

Del Rio *et al.* (2001), avaient observé que l'accumulation des polyphénols se fait en relation avec la sévérité de l'infection. Cela va dans le sens de nos observations : l'accumulation des stilbènes est forte dans le cas de *N. parvum* Per20 qui forme de larges nécroses dans les

boutures alors que dans les boutures inoculées par *D. seriata* BoF98-1 aucune nécrose n'apparaît et l'accumulation de stilbènes n'est pas significativement différente du contrôle.

La forte accumulation des oligomères et non pas des monomères de resvératrol et des flavan-3-ols, dans les boutures inoculées par *N. parvum*, associée avec leur fort effet inhibiteur de la croissance mycélienne, semble confirmer que ces composés puissent être des molécules de défense au sein des tissus ligneux. Néanmoins, au regard de la taille des nécroses, il semble que ces composés ne suffisent pas à arrêter le développement du champignon. Cette hypothèse, dans le cas de *N. parvum*, avait déjà été émise lors de notre étude « essais antimicrobiens » : en effet, les tests *in vitro* ont montré que *N. parvum* Per20 est parmi les champignons les moins sensibles de la famille des Botryosphaeriaceae. Par exemple, l' $\epsilon$ -viniférine à 500  $\mu\text{M}$  inhibe la croissance mycélienne de *N. parvum* de seulement 25% alors que l'inhibition est de 73% pour *D. seriata* BoF98-1. Le comportement de *N. parvum* Per20 est très semblable à celui de *N. parvum* Bp0014 sur lequel ont été testés les oligomères. Pour ce dernier, l'inhibition de sa croissance par le miyabénol C était de 57% et de seulement 27 et 34% dans le cas de l'hopéaphénol et de l'isohopéaphénol qui sont deux oligomères dominants. L'ampélopsine A n'a pas d'effet sur *N. parvum* Bp0014.

**Tableau XXV** : Comparaison des teneurs en stilbènes dans les boutures de Merlot non inoculées ou infectées par *N. parvum* Per20 et des concentrations de ces mêmes composés utilisés dans les tests d'inhibition de la croissance mycélienne mis en œuvre au chapitre 4. Les pourcentages d'inhibition obtenus avec les concentrations de l'essai antifongique sont rappelés.

Polyphénol	Teneurs dans les boutures non inoculées ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF)	Teneurs dans les boutures inoculées par <i>N. parvum</i> Per 20 ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF)	Teneurs dans les boutures inoculées par <i>D. seriata</i> BoF98-1 ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF)	Teneurs dans le milieu de l'essai antifongique ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de milieu)	Pourcentage d'inhibition de la croissance de <i>D. seriata</i> BoF99-1	Pourcentage d'inhibition de la croissance de <i>N. parvum</i> Bp0014
$\epsilon$ -viniférine	649	1208	772	210	85	25
miyabénol C	311	752	426	318	90	57
hopéaphénol	1147	1887	1080	424	27	27
isohopéaphénol	875	3197	1252	424	52	34

Les teneurs en composés phénoliques dans les boutures inoculées ou non sont au moins de l'ordre de celles utilisées dans l'essai antifongique *in vitro* (Tableau XXV). Les teneurs en miyabénol C, en  $\epsilon$ -viniférine, en hopéaphénol et en isohopéaphénol sont respectivement 2,4 ; 5,6 ; 4,5 et 7,5 fois plus importantes dans les boutures inoculées que celles utilisées *in vitro*. Dans nos essais *in vitro* ces molécules, aux concentrations testées, étaient aptes à inhiber *N. parvum* Bp0014 à hauteur de 25 à 57%. Cela sous-entend qu'à des concentrations nettement supérieures, tel que ce que nous observons *in planta*, leur action devrait être plus importante. Toutefois ces concentrations ne suffisent pas à contenir le développement de ce champignon.

Cependant, le développement de *D. seriata* BoF98-1, très sensible aux polyphénols, est bien inférieur à celui de *N. parvum* Per20 dans les boutures. Les boutures infectées par *D. seriata* BoF98-1, bien que ne présentant pas de différences significatives montrent des moyennes de teneurs en stilbènes légèrement supérieures à celles des boutures témoin (Tableau XXV). Cela pourrait signifier que la plante répond tout de même à la présence de *D. seriata*, très sensibles aux polyphénols. Les concentrations dans les boutures inoculées par *D. seriata* sont de l'ordre de celles utilisées dans nos essais (Tableau XX). Par comparaison avec un autre *D. seriata* (BoF99-1) l' $\epsilon$ -viniférine inhibait la croissance de ce champignon de 85%, le miyabénol C de 90%, l'isohopéaphénol de 52% et l'hopéaphénol de 27%. Il est possible que ces quantités de polyphénols permettent de maîtriser le développement de *D. seriata*.

En dernière remarque, cette expérience nous a permis de montrer que la sensibilité d'un champignon à l'effet antimicrobien d'un composé phénolique observée *in vitro* (chapitre 4), peut être vérifiée *in planta*.

***En résumé, après avoir montré dans le chapitre 3 que les oligomères de stilbènes comme l' $\epsilon$ -viniférine, le miyabénol C et l'isohopéaphénol ont un fort pouvoir fongistatique, nous avons ici observé que ces composés s'accumulent lors d'une infection par N. parvum. Ce dernier particulièrement agressif et peu sensible aux stilbènes (cf. chapitre 3), forme une large nécrose tandis que D. seriata, plus sensible aux stilbènes ne parvient pas à se développer dans la bouture. Nos résultats plaident donc en la faveur du rôle des stilbènes dans les défenses de la vigne contre les maladies du bois et cependant montrent que leur effet est dépendant de la sensibilité de l'agresseur à l'effet toxique des stilbènes.***

## II. Comparaison des réponses de défense chez trois cépages de sensibilité différente à l'esca

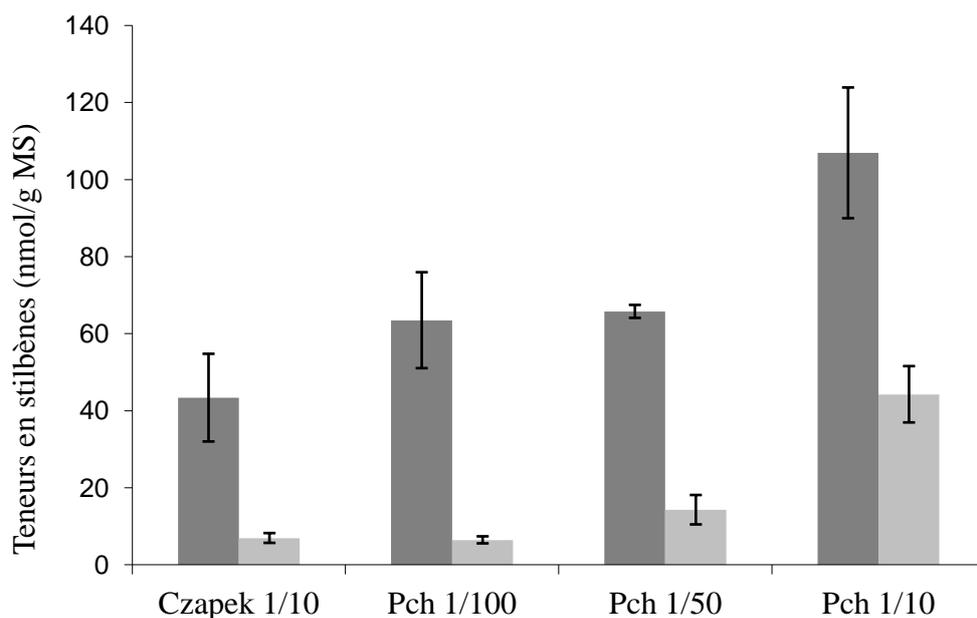
La sensibilité des cépages de *V. vinifera* aux maladies du bois est variable. Par exemple, le Merlot et le Carignan sont plutôt tolérants à l'esca tandis que le Cabernet-Sauvignon y est très sensible. La compréhension des mécanismes sous-jacents à ces différences de sensibilité pourrait permettre de mieux comprendre la réponse de la vigne à l'esca. La tolérance peut s'exercer à de multiples niveaux. Un des niveaux se présente par une réponse de défense plus précoce et plus intense par les plantes tolérantes lors de l'attaque d'un agent pathogène.

Pour tester cette hypothèse, nous avons mis au point un essai dans lequel, la base de la partie herbacée des boutures foliaires est immergée dans un filtrat de milieu de culture de *P. chlamydospora* dilué. L'objectif est ici de mimer l'afflux des composés sécrétés par le champignon, parmi lesquels des toxines, vers les organes foliaires. En effet, il est connu que l'apparition des symptômes foliaires est corrélée à une induction de défenses (Letousey *et al.* 2010 ; Magnin-Robert *et al.* 2011) et que ces symptômes sont probablement dus à la circulation des toxines dans la sève brute (Bruno & Sparapano 2007a).

Le filtrat du milieu de culture de *P. chlamydospora* peut être utilisé pour mimer le champignon lui-même car ce filtrat contient de nombreux composés phytotoxiques identiques à ceux identifiés dans la sève de plantes infectées par ce même champignon (Bruno & Sparapano 2007a, 2007b). De plus, ce filtrat peut induire l'expression de *PAL* le gène de la phénylalanine ammonialyase, la première enzyme de la voie de biosynthèse des composés phénoliques, dans des cultures cellulaires de vigne (Luini *et al.* 2010). Il a également été démontré que le milieu de culture de *P. chlamydospora* stimule la synthèse de stilbènes et l'expression de gènes liés à la défense codant une phénylalanine ammonialyase, une stilbène synthase et des PR-protéines (Lima *et al.* 2012).

## II.1. Mise au point

Après avoir porté notre choix sur *P. chlamydospora* pour la production du filtrat éliciteur, son effet éliciteur a été vérifié sur Cabernet-Sauvignon et les résultats sont présentés Figure 22. Plusieurs dilutions ont été testées : 1/100<sup>ème</sup>, 1/50<sup>ème</sup>, 1/10<sup>ème</sup> et 1/5<sup>ème</sup>. L'effet inducteur des défenses a été évalué par dosage des teneurs en picéide et en resvératrol, les deux stilbènes majoritaires des feuilles. Après 24h d'élicitation les feuilles sont récoltées. Seule la dilution 1/10<sup>ème</sup> a permis d'induire une accumulation de picéide et de resvératrol significativement différente du contrôle, la dilution au 1/5<sup>ème</sup> ayant eu un effet phytotoxique trop important et cela dès les premières 24h (résultats non montrés). La dilution au 1/10<sup>ème</sup> sera celle utilisée pour comparer la production de stilbènes et l'expression de gènes de défense dans les feuilles des trois cépages.



**Figure 22** : Teneurs en stilbènes dans les feuilles de boutures, après 24h d'élicitation par le filtrat de milieu de culture de *P. chlamydospora* (Pch). Trois dilutions ont été testées : 1/100<sup>ème</sup>, 1/50<sup>ème</sup> et 1/10<sup>ème</sup>. Le contrôle (Czapek 1/10) correspond au milieu de culture Czapek Dox modifié dilué au 1/10<sup>ème</sup> sans agent pathogène. Les barres gris foncé correspondent au *trans*-picéide et les barres gris clair au *trans*-resvératrol. Les résultats représentent la moyenne des teneurs en stilbènes dans les feuilles de trois plants  $\pm$  écart type.

## II.2. Comparaison de la production de stilbènes dans les feuilles des trois cépages élicités

La production de stilbènes a été suivie aux temps 0, 3, 6, 12, 18 et 24h. Les stilbènes quantifiés sont le *trans*-picéide, le *trans*-resvératrol et l' $\epsilon$ -viniférine. Les résultats pour chacune des molécules sont présentés Figure 23.

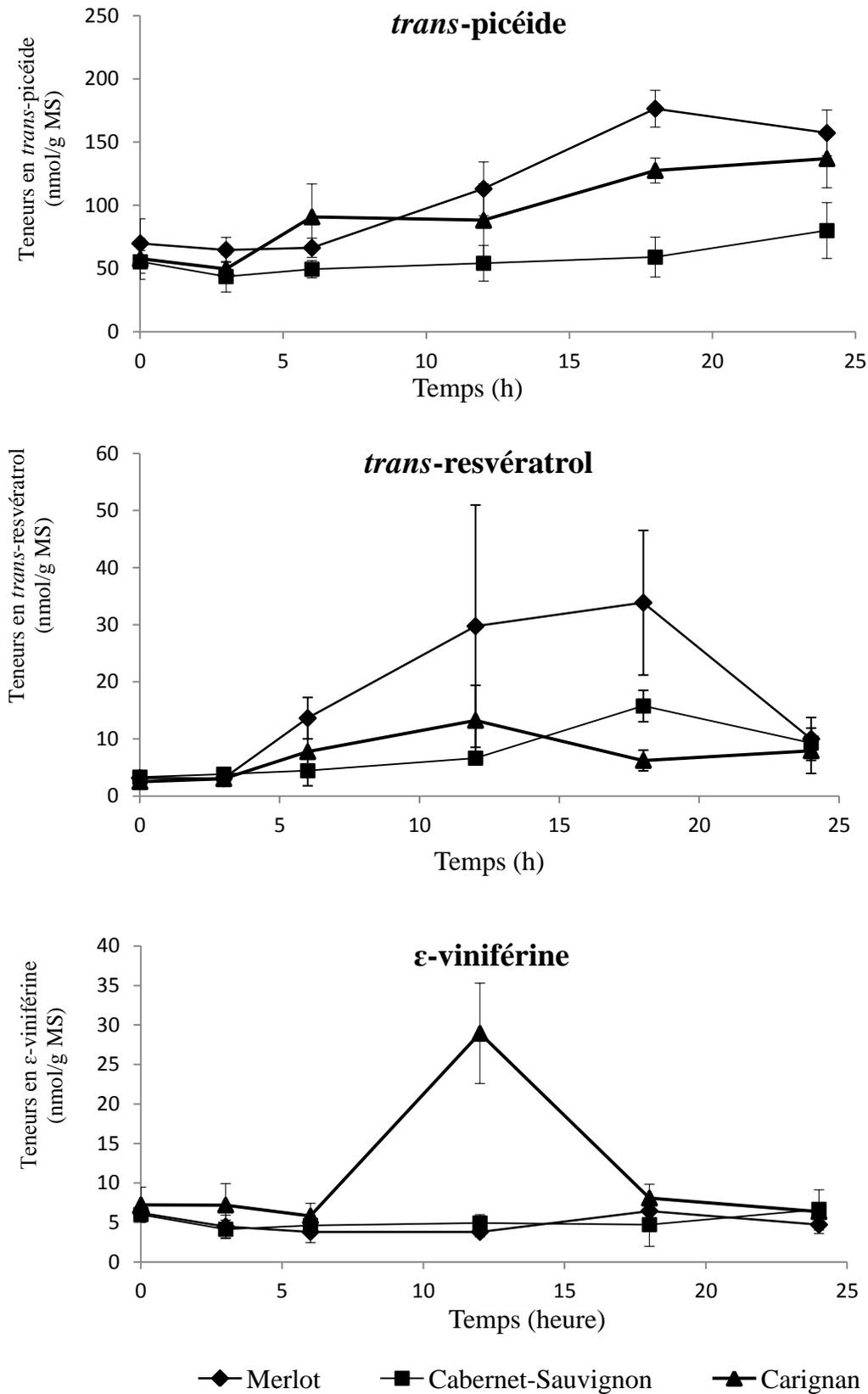
Au temps 0h, les teneurs sont les mêmes, quel que soit le stilbène considéré dans les feuilles des trois cépages. Le *trans*-picéide est de loin la molécule majoritairement accumulée dans les feuilles : entre 40 et 180 nmol/g MS. Les teneurs en *trans*-resvératrol et en  $\epsilon$ -viniférine oscillent entre 5 et 35 nmol/g MS.

Chez le Carignan, une accumulation de *trans*-picéide, de *trans*-resvératrol et d' $\epsilon$ -viniférine est observée dans les feuilles suite à l'élicitation. Le pic d'accumulation est atteint à 18h pour le *trans*-picéide et  $\epsilon$ -viniférine et à 12h pour le resvératrol. Les valeurs maximales sont de l'ordre de 115 nmol/g MS pour le *trans*-picéide, 12 nmol/g MS pour le *trans*-resvératrol et 30 nmol/g MS pour l' $\epsilon$ -viniférine. Le Carignan est le seul cépage à accumuler ce dernier composé.

Une accumulation de *trans*-resvératrol et de *trans*-picéide est également observée dans les feuilles de Merlot : à 18h les teneurs en *trans*-picéide atteignent un maximum de 170 nmol/g MS et à 12h, les teneurs en *trans*-resvératrol atteignent un maximum de 32 nmol/g MS. Il y a donc une plus forte accumulation de *trans*-picéide et de *trans*-resvératrol dans les feuilles de Merlot que dans les feuilles de Carignan.

Enfin, dans les feuilles de Cabernet-Sauvignon, seule une faible accumulation de *trans*-resvératrol est significativement observée à 18h.

Au bilan, des différences en terme de stilbènes apparaissent dans les feuilles, suite à l'élicitation par le filtrat de *P. chlamydospora*, entre le Merlot et le Carignan, tolérants à l'esca et le Cabernet-Sauvignon, sensible à cette maladie. Le Merlot et le Carignan accumulent deux à trois fois plus de *trans*-picéide que le Cabernet-Sauvignon pour lequel on n'observe pas d'augmentation significative de la synthèse de ce composé. Les deux cépages tolérants accumulent plus fortement pour le Merlot et plus précocement pour le Cabernet-Sauvignon, le *trans*-resvératrol dans leurs tissus que ne le fait le Cabernet-Sauvignon. Enfin, le Carignan est le seul cépage à accumuler l' $\epsilon$ -viniférine avec une forte induction à 12h.



**Figure 23 :** Teneurs en *trans*-picéide, en *trans*-resvératrol et en  $\epsilon$ -viniférine dans les feuilles de Merlot, Cabernet-Sauvignon et de Carignan, élicitées par le filtrat de *P. chlamydospora*. Les valeurs exprimées en nmol/g de matière sèche de feuille correspondent à la moyenne  $\pm$  écart-type de trois répétitions indépendantes de trois réplicats chacune.

### II.3. Comparaison de l'expression de gènes de défense dans les feuilles des trois cépages

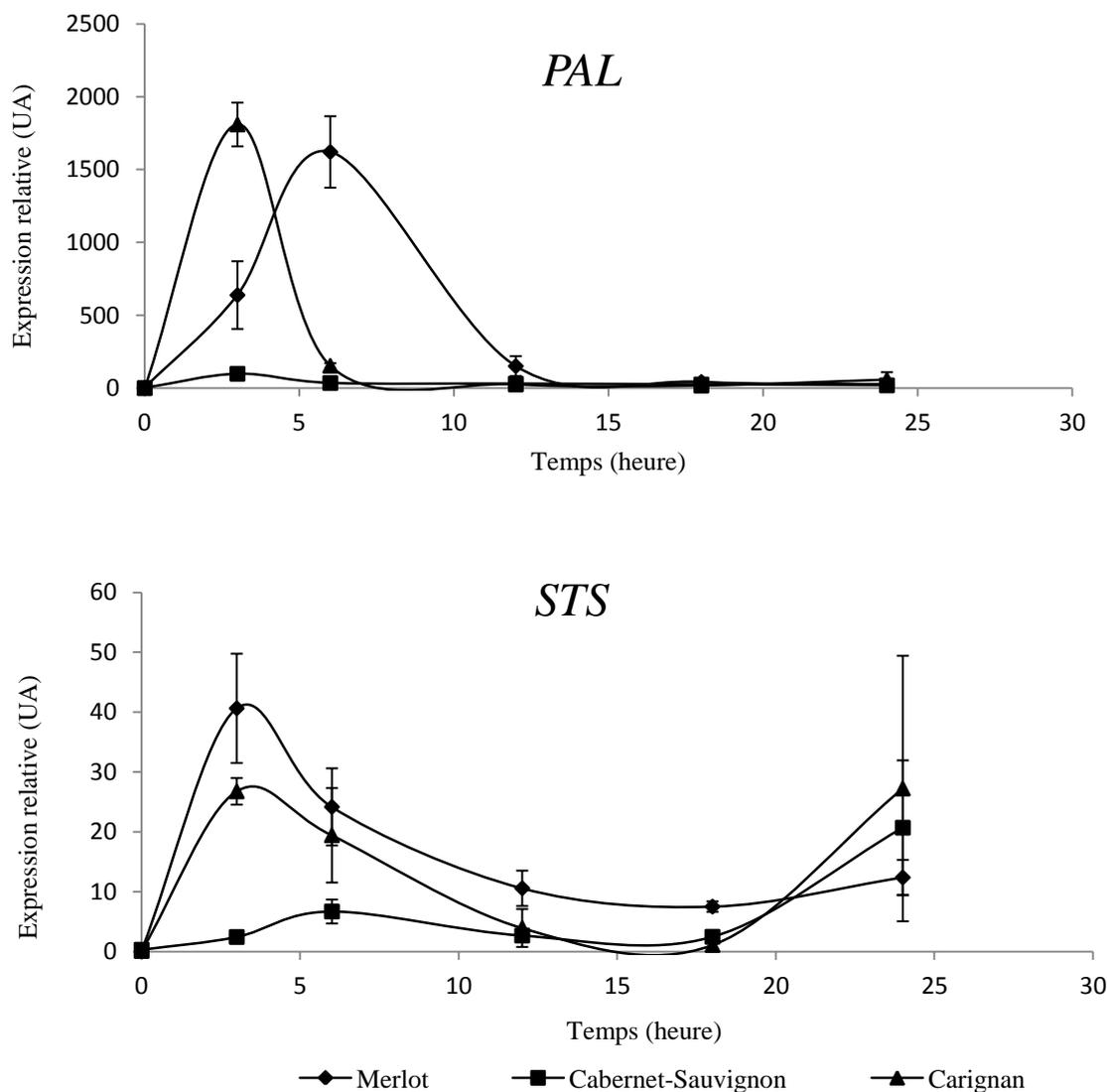
En parallèle du suivi de l'accumulation des stilbènes, l'expression de certains gènes impliqués dans la défense a été suivie par PCR quantitative. Il s'agit de deux gènes codant des enzymes de la voie des phénylpropanoïdes : *PAL*, pour la phényalanine ammonialyase, l'enzyme catalysant la première réaction de cette voie de biosynthèse et *STS*, pour la stilbène synthase, l'enzyme par laquelle est formé le *trans*-resvératrol, lui-même précurseur du *trans*-picéïde et de l' $\epsilon$ -viniférine. L'expression de quatre autres gènes a été suivie, ces gènes codant une  $\beta$ -1,3-glucanase (*Glu*), une chitinase (*Chi4C*), un inhibiteur de protéase à sérine (*PIN*) et une protéine inhibitrice de polygalacturonase (*PGIP*). L'expression de ces gènes, à l'exception de *PGIP*, est connue pour augmenter fortement dans des feuilles pré-symptomatiques de vigne atteinte par l'esca (forme lente) (Magnin-Robert *et al.* 2002).

#### II.3.1. Suivi de l'expression de gènes de la voie des phénylpropanoïdes

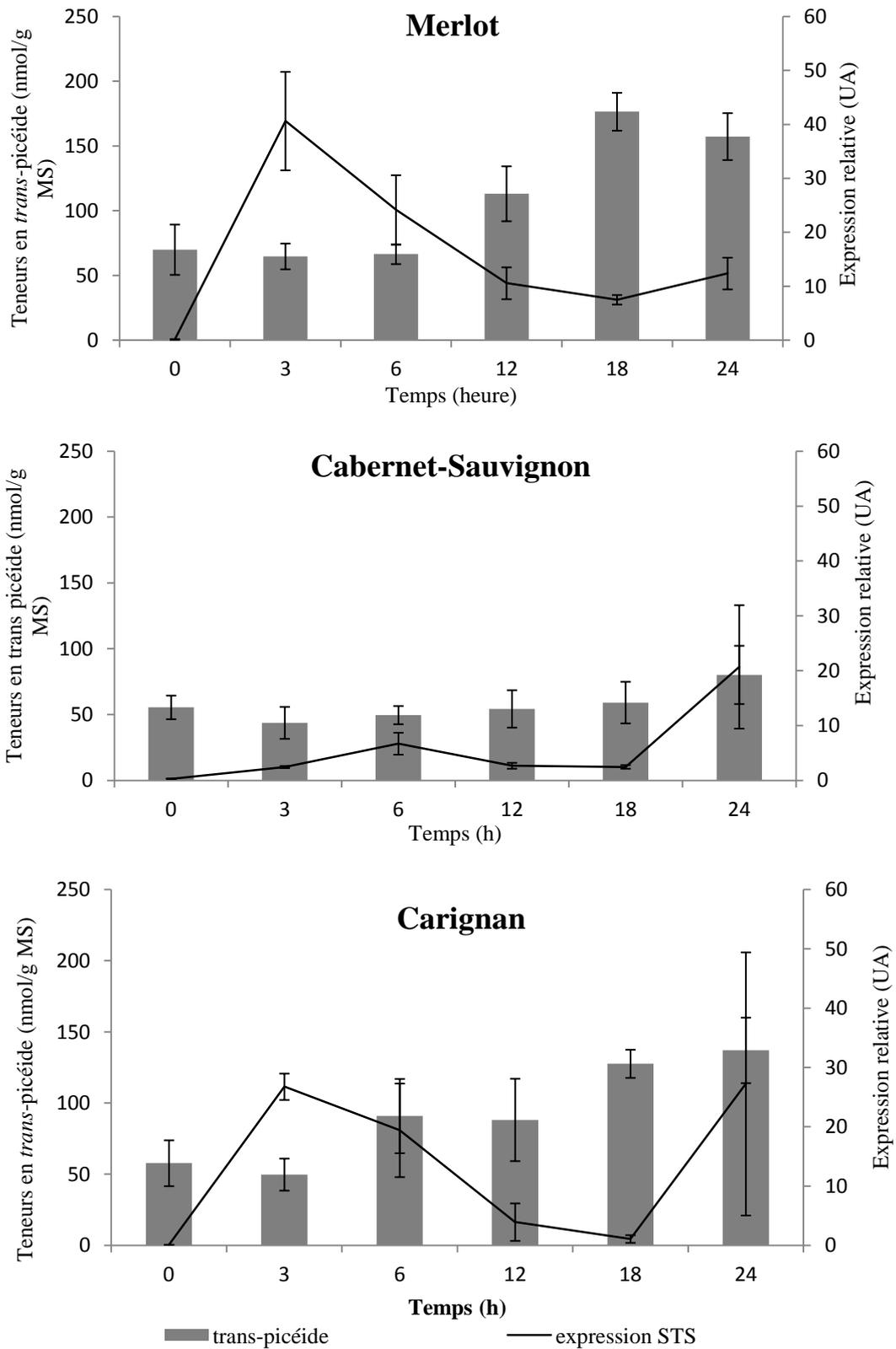
La Figure 24 présente les résultats de suivi de l'expression de la *PAL* et de la *STS*. L'expression de *PAL* est très fortement induite chez le Merlot et le Carignan, d'un facteur supérieur à 1500. En revanche, une induction très faible est observée chez le Cabernet-Sauvignon (< 100). Le pic d'expression se situe à 3h chez le Carignan et le Cabernet-Sauvignon et à 6h chez le Merlot.

Le profil de *STS* semble présenter deux pics d'induction et cela quel que soit le cépage. Le premier pic se situe au temps 3h chez le Carignan et le Merlot. Comme pour *PAL*, *STS* est fortement induit chez les deux tolérants, d'un facteur 40 pour le Carignan et 25 pour le Merlot. Dans les feuilles de Cabernet-Sauvignon, le facteur d'induction de l'expression de *STS* est inférieur à 10 et le premier pic d'accumulation se situe à 6h. Au temps 24h l'expression de *STS* semble augmenter à nouveau dans les trois cépages et pour ce deuxième pic l'induction semble aussi importante quel que soit le cépage considéré.

Comme cela avait été observé pour l'accumulation des stilbènes, l'expression de *PAL* et de *STS* est plus intense, voire plus précoce dans les deux cépages tolérants à l'esca, le Merlot et le Carignan, que dans le cépage sensible, le Cabernet-Sauvignon.



**Figure 24 :** Évolution de l'expression de gènes codant une phénylalanine ammonialyase (*PAL*) et une stilbène synthase (*STS*) dans les feuilles de boutures de Merlot, Cabernet-Sauvignon et Carignan, au cours d'une élicitation de 24h par un filtrat de milieu de culture de *P. chlamydospora* dilué au 1/10.



**Figure 25** : Comparaison de la production de *trans*-picéide (le stilbène majoritaire) et de l'expression du gène stilbène synthase (*STS*) dans les feuilles de boutures de Merlot, Cabernet-Sauvignon et Carignan, élicitées par un filtrat de milieu de culture *P. chlamydospora* pendant 24h.

La Figure 25 permet de visualiser la synthèse du *trans*-picéide, le stilbène majoritaire dans les feuilles. En parallèle, dans cette même figure est présentée l'expression de *STS*. En effet, le *trans*-picéide dérive directement du resvératrol synthétisé par la stilbène synthase, mais ce dernier s'accumule très faiblement. Chez le Carignan et le Merlot, une accumulation de *trans*-picéide (environ 2 fois plus importante qu'à 0h) se produit à 6 et 12h respectivement et celle-ci découle du pic d'expression de la *STS* observée à 3h. Chez le Cabernet-Sauvignon, aucune production significative de *trans*-picéide n'est notée. Cela est bien corrélé à la faible induction de l'expression de *STS*.

### II.3.2. Suivi de l'expression de gènes codant des protéines PR

Quatre autres gènes correspondant à des protéines de défense ont également été suivis et les résultats sont présentés Figure 26. Ces gènes codent pour une  $\beta$ -1,3-glucanase (*Glu*), une chitinase (*Chi4C*), une protéine inhibitrice de polygalacturonases (*PGIP*) et un inhibiteur de protéase à sérine (*PIN*). Les *PGIP* et les *PIN* ont pour rôle d'inhiber les polygalacturonases et les protéases fongiques impliquées dans la pathogenèse (Gomathi 2004, Habib 2007). Les chitinases et les  $\beta$ -1,3-glucanases ont quant à elles une activité antifongique directe en dégradant les composants de la paroi des champignons (Punja & Zhang 1993 ; Leubner-Metzger & Meins 1999).

En toute première observation, nous notons que les profils d'expression varient considérablement selon le gène considéré et le cépage analysé.

Le gène *PGIP* est un gène fortement exprimé. Un pic d'induction est observé à 3h pour le Merlot et le Cabernet-Sauvignon et à 6h pour le Merlot. L'intensité de l'induction est très différente selon le cépage : elle est de 120, 50 et 25 pour le Carignan, le Merlot et le Cabernet-Sauvignon, respectivement.

Le pic d'expression de *PIN* est retardé par rapport à celui de *PGIP*. En effet pour le Merlot et le Carignan, c'est à 18 h que le nombre de transcrits est maximum (25 pour le Merlot et 15 pour le Carignan). Toutefois, une augmentation légère (5) de l'expression de *PIN* est observée à 6h chez le Merlot. L'expression de ce gène ne varie pas au cours de notre expérience chez le Cabernet-Sauvignon.

L'expression du gène *Chi4C* ne varie pas de manière significative au cours des 24h de traitement chez le Merlot et le Cabernet-Sauvignon. Dans le cas du Carignan, deux pics d'accumulation de transcrits sont observés à 3h (9) et à 12h (2,5).

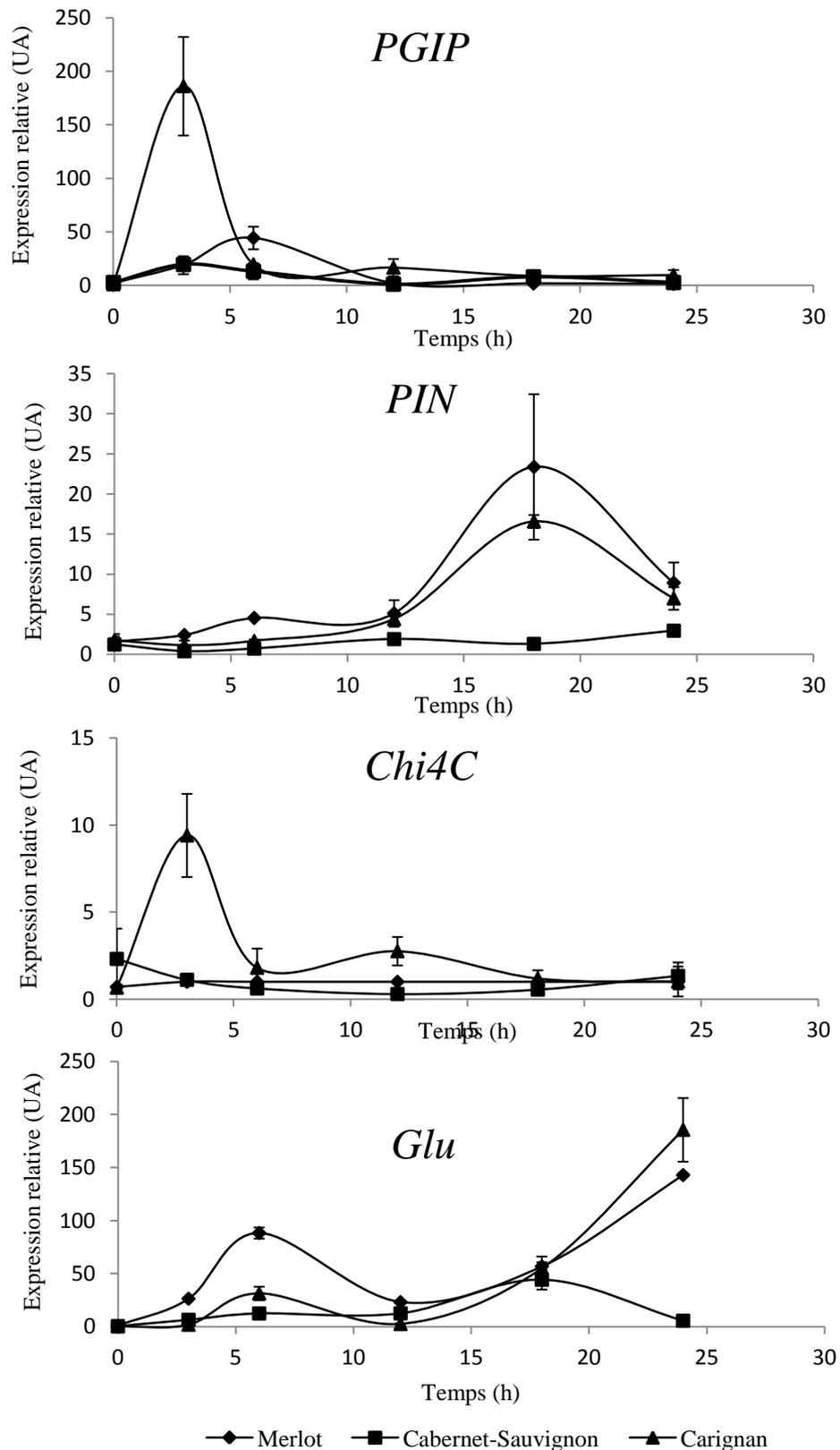
En ce qui concerne *Glu*, ce gène est fortement exprimé, tout comme *PGIP*. Le Carignan et le Merlot présentent le même profil d'accumulation de transcrits *Glu* avec 2 pics d'induction : un pic à 6h (90 et 25 respectivement) et une nouvelle augmentation à partir de 18h qui se poursuit encore à 24h (150 et 180 respectivement). L'expression de *Glu* dans les feuilles de Cabernet-Sauvignon est marquée par un petit pic d'accumulation à 18h (<50).

L'expression de ces gènes codant des protéines PR est toujours plus élevée ou égale dans les cépages dits tolérants (Merlot et Carignan) que dans le cépage sensible à l'esca (Cabernet-Sauvignon), à l'exception du gène *Chi4C* pour lequel le Merlot ne présente pas de variations de l'expression.

## II.4. Discussion

L'objectif de cette partie était de déterminer si le niveau de tolérance notée par certains cépages vis-à-vis des maladies du bois pouvait être corrélé à une induction plus ou moins intense et/ou précoce des réponses de défense.

Pour cela, nous avons choisi d'éliciter des boutures foliaires de trois cépages : Merlot et Carignan tolérants à l'esca et Cabernet-Sauvignon, sensible à l'esca et de suivre leurs réponses de défense. L'élicitation a été réalisée par un filtrat de milieu de culture de *P. chlamydospora* par une méthode que nous avons appelé « absorption » et qui consiste à plonger l'extrémité coupée de la tige de la bouture directement dans le filtrat dilué. En effet ce filtrat est connu pour renfermer de nombreux composés phytotoxiques (enzymes, naphtalénones, pullulanes, polypeptides) dont il est supposé qu'ils sont à l'origine de l'apparition des symptômes foliaires (Bruno & Sparapano 2007a). Ce filtrat est également capable de stimuler l'expression d'un gène codant une phénylalanine ammonia-lyase dans des cultures cellulaires de vigne (Luini *et al.* 2010).



**Figure 26 :** Évolution de l'expression de gènes codant une  $\beta$ -1,3-glucanase (*Glu*), une chitinase (*Chi4C*), une serine-protease inhibitor (*PIN*) et une protéine inhibitrice de polygalacturonase (*PGIP*) dans les feuilles de boutures de Merlot, Cabernet-Sauvignon et Carignan, au cours d'une élicitation de 24h par un filtrat de milieu de culture de *P. chlamydospora*.

Nos résultats ont montré que les boutures foliaires élicitées par absorption d'un filtrat de culture de Pch induisent la synthèse de plusieurs stilbènes et de plusieurs gènes de défense.

Toutefois, comme les boutures foliaires ont été coupées afin de pouvoir assurer leur absorption du filtrat *via* le xylème, l'éventuelle conséquence de la blessure en tant qu'élicitation peut être émise. En effet une blessure peut notamment induire la phénylalanine ammonia-lyase comme cela a été démontré chez la laitue (Campos *et al.* 2004). Néanmoins, lors de nos expériences de mise au point, nous avons relevé un réel effet inducteur sur la production des stilbènes de la part des boutures coupées et plongées dans un filtrat de Pch et non de la part de celles coupées et plongées dans le milieu de culture du champignon. De plus, comme l'induction du gène *PAL* dans les feuilles de Cabernet-Sauvignon est très faible, on peut supposer que l'effet coupure ne perturbe pas l'expression liée à l'élicitation elle-même.

Il est donc évident que le filtrat de culture de Pch induit la production de *trans*-picéïde, de *trans*-resvératrol et d' $\epsilon$ -viniférine dans les feuilles des boutures des trois cépages qui l'ont absorbé. Par ailleurs, nous avons noté que les deux cépages tolérants accumulent plus de composés phénoliques que le cépage sensible. Ce résultat est en accord avec les travaux de Bruno et de ses collaborateurs (2006b) qui ont montré que les teneurs en resvératrol dans la sève brute de plantes infectées par *P. chlamydospora* sont plus élevées chez le cépage Matilde tolérant que chez le cépage sensible Italia.

L'expression de *PAL* et de *STS* est plus fortement et précocement induite dans les cépages tolérants, au contraire du cépage sensible. Une induction de ces gènes a été observée dans des feuilles de ceps atteints de la forme sévère et lente de l'esca (Letousey *et al.* 2010, Magnin-Robert *et al.*, 2011) et cela suggère que notre système d'élicitation peut mimer, pour la synthèse des stilbènes, les phénomènes qui ont lieu dans la plante malade. Dans le cas de la stilbène synthase, l'expression du gène correspondant est corrélée à l'accumulation des métabolites, comme c'est souvent le cas (Belhadj *et al.* 2006, Belhadj *et al.* 2008).

La très forte induction de *PAL* suggère que d'autres composés phénoliques pourraient être induits au cours de l'élicitation. On peut notamment penser des composés phénoliques que nous n'avons pas étudiés : la lignine pour le renforcement pariétal mais également les flavonoïdes qui pourraient par exemple inhiber l'activité d'enzymes fongiques (Goetz 1999).

Au niveau de l'expression des gènes codant les protéines PR, des différences similaires sont observées entre les tolérants et le sensible : les niveaux d'expression sont plus élevés chez au

moins un des deux tolérants. Cependant ce ne sont pas les mêmes gènes qui sont induits chez l'un ou l'autre de ces cépages. L'expression de *PGIP* et de *Chi4C* est forte chez le Carignan et faible voire nulle chez le Merlot tandis que *Glu* et *PIN* sont plus exprimés chez le Merlot. Ces résultats suggèrent une régulation différente de l'expression de ces gènes dans les deux cépages tolérants suite à une élicitation par l'agent de l'esca, *P. chlamydospora*. Pour d'autres cépages de *V. vinifera*, il a été montré que la composition protéique du moût varie significativement entre les variétés au niveau des chitinases et des « thaumatine like » (Hayasaka *et al.* 2001). Il est donc normal d'observer des profils d'expression différents entre nos cépages tolérants.

Pour *PIN* et *Glu*, deux pics d'expression sont observés : un précoce à 3 ou 6h et un deuxième pic à 18h. La présence du premier pic, moins important que le second, pourrait être un artefact, une réponse à la blessure. Comme pour la forte activation de la *PAL*, si l'on n'observe pas ce premier pic chez le Cabernet-Sauvignon, ne doit-on pas alors considérer que ce premier pic n'est pas un artefact ?

***En résumé, les résultats ont montré que les réponses de défense des cépages tolérants, Merlot et Carignan, sont plus intenses et/ou plus précoces que celles du cépage sensible, Cabernet-Sauvignon. Que ce soit en terme de production de stilbènes, d'expression des gènes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et dans une moindre mesure des protéines PR, tous les résultats suggèrent que les deux cépages tolérants sont plus aptes à mieux se défendre que le cépage sensible face à la présence d'éliciteurs de P. chlamydospora.***

### III. Conclusion

L'objectif de ce chapitre était à la fois de rechercher quels stilbènes sont induits par l'inoculation d'un agent de maladies du bois et aussi de comparer les réponses de défense entre trois cépages de sensibilité différente à l'esca.

Pour cela des boutures ont été inoculées avec deux Botryosphaeriaceae : *N. parvum* Per20 et *D. seriata* BoF98-1. Les résultats des dosages des polyphénols ont permis de mettre en évidence que les molécules induites sont des oligomères de resvératrol : l'ampélopsine A, l' $\epsilon$ -viniférine, le miyabénol C, deux trimères inconnus, l'hopéaphénol et l'isohopéaphénol. Dans le chapitre précédent nous avons montré que ces composés, excepté l'ampélopsine A, ont un fort pouvoir fongistatique contre les agents de maladie du bois. Il semble que plus l'espèce est agressive, moins elle est sensible aux stilbènes et plus les composés phénoliques sont induits dans le bois. Cette forte concentration de stilbènes dans le bois n'empêche pas pour autant l'agent pathogène de se développer.

La comparaison des réponses de défense entre les cépages de sensibilité variable à l'esca a montré à tous les niveaux que la réponse des cépages tolérants est plus forte et/ou plus précoce. L'accumulation de stilbènes dans les feuilles ainsi que l'expression des gènes de leur voie de biosynthèse et de protéines PR, ont toutes deux montré que le comportement des deux tolérants, qui est par ailleurs très semblable, est toujours plus efficace que celui du cépage sensible.

# CHAPITRE 6 : Polyphénols constitutifs des sarments et induits par l'esca

---

Les résultats présentés dans les chapitres précédents, nous ont permis d'identifier les stilbènes des sarments de la vigne et de mettre en évidence l'activité antifongique de ces composés à l'égard de plusieurs agents pathogènes responsables de maladies du bois de la vigne. D'autre part, nos résultats montrent que les oligomères, de par leur forte activité inhibitrice de la croissance mycélienne, et leur induction dans des boutures infectées par *N. parvum*, sont des molécules d'intérêt dans l'étude des défenses de la vigne contre les maladies du bois.

L'objectif de ce chapitre est de s'intéresser, en conditions de plein-champ, aux stilbènes « constitutifs » des sarments et à ceux potentiellement induits par l'esca.

Nous avons choisi de travailler sur les sarments. Ils sont un modèle d'étude intéressant des tissus ligneux car leur prélèvement est aisé puisqu'ils sont taillés chaque année et de manière non destructive pour la plante. Au contraire le prélèvement d'échantillons de cep est plus complexe et altère définitivement la plante. De plus, les sarments font partie des organes où se développent certains agents de maladies du bois comme *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* (Troccoli *et al.* 2001, Bruno & Sparapano 2007 a).

Grâce à l'identification des stilbènes des sarments de *V. vinifera* réalisée au chapitre 3, le dosage de ces composés a été possible dans les sarments de 15 cépages issus de la collection de l'INRA de Villenave d'Ornon. Les teneurs en polyphénols obtenues à partir des sarments des 15 cépages, teneurs des polyphénols dits « constitutifs », ont été ensuite comparées au niveau de sensibilité de ces cépages vis-à-vis des maladies du bois.

Grâce à une parcelle de Cabernet-Sauvignon, dite parcelle « esca », les teneurs en polyphénols ont également été analysées dans les sarments de plantes exprimant régulièrement des symptômes d'esca et dans ceux de plantes ne présentant jamais de symptômes sur 4-5 ans de suivi. En plus de l'effet « esca », cette parcelle étant caractérisée par une zone argileuse et une zone graveleuse, nous avons également comparé l'effet du type de sol sur les teneurs en polyphénols dans les sarments.

## I. Étude des polyphénols constitutifs de 15 cépages de *V. vinifera*

Dans les descriptions de mécanismes de défenses des plantes, une distinction est souvent faite entre les défenses dites constitutives et celles dites induites. Les défenses constitutives consistent en des barrières physiques comme les poils, la cuticule ou encore des barrières chimiques formées par des molécules toxiques appelées phytoanticipines. Les phytoanticipines, au contraire des phytoalexines, sont des substances sécrétées par les cellules végétales en l'absence d'agent pathogène. Ces composés sont une première ligne de défense dans le cas d'une attaque microbienne.

Dans les tissus ligneux de la vigne, les stilbènes pourraient jouer à la fois le rôle de phytoanticipines et de phytoalexines. En effet, il a été rapporté que les stilbènes sont des molécules synthétisées de manière constitutive dans ces tissus comme le *trans*-resvératrol, l' $\epsilon$ -viniférine (Langcake & Pryce 1976, Pussä *et al.* 2006) dont la synthèse est aussi induite lors d'une infection par *P. chlamydospora* (Martin *et al.* 2009).

L'objectif est ici d'évaluer si la quantité de polyphénols constitutifs présents dans le bois peut expliquer une meilleure tolérance de la vigne aux maladies du bois. Pour cela, les teneurs en polyphénols ont été déterminées dans les sarments « sains » de 15 cépages de *V. vinifera* et ont été comparées au niveau de sensibilité de chaque cépage vis-à-vis des maladies du bois.

## I.1. Effet du cépage sur les teneurs en polyphénols des sarments

Les 11 composés phénoliques identifiés dans le chapitre 3 : (la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine, le *trans*-picéide, le *trans*-picéatannol, le *trans*-resvératrol, l' $\epsilon$ -viniférine, l'ampélopsine A, le miyabénol C, l'hopéaphénol et l'isohopéaphénol, ont été quantifiés par HPLC dans les sarments de 15 cépages prélevés en janvier 2011 : Cabernet franc, Cabernet-Sauvignon, Carignan, Chardonnay, Chenin, Cinsault, Gamay, Gewurztraminer, Grenache, Melon, Merlot, Pinot noir, Riesling, Sauvignon, Sémillon, Syrah, Ugni blanc. La sensibilité des cépages à l'esca est rappelée dans le Tableau XXVI. Les résultats de ces dosages sont présentés également présentés dans ce Tableau.

Les composés majoritaires du point de vue des quantités sont la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine, le *trans*-resvératrol et l' $\epsilon$ -viniférine. Puis ensuite, le *trans*-picéatannol, l'hopéaphénol et l'isohopéaphénol. Les teneurs les plus faibles correspondent au *trans*-picéide. L'ampélopsine A et le miyabénol C étant exprimés en  $\mu\text{g}$  d'équivalent resvératrol il n'est pas possible de les quantifier de façon absolue. Nous observons des variations importantes selon le cépage considéré : pour exemple la teneur en  $\epsilon$ -viniférine varie de 304 à 1707  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MS pour le Carignan et le Pinot noir respectivement. Ces variations ne sont que quantitatives car nous n'avons pas identifié de composés qui soient synthétisé dans un cépage et pas dans un autre.

**Tableau XXVI** : Teneurs en polyphénols dans les sarments de 15 cépages. La sensibilité des cépages aux maladies du bois est rappelée (T = tolérant incidence <2% vert foncé, S = sensible, 2-5% vert clair et TS= très sensible, >5% rose). Les valeurs, exprimées en µg par g de matière sèche, représentent la moyenne de dosages réalisés sur les sarments de 3 ceps ± écarts-types. \* L'ampélopsine A et le miyabénol C sont exprimés en µg d'équivalent resvératrol. La couleur gris foncé met en avant les valeurs supérieures à 500 µg.g<sup>-1</sup> MS et les cases gris-clair, les valeurs supérieures à 200 µg.g<sup>-1</sup> MS.

Sensibilité à l'eutypiose	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	S	TS	TS	S
Sensibilité à l'esca	TS	TS	TS	T	T	T	T	T	S	T	TS	TS	TS	TS	TS
Teneurs en polyphénols (µg.g <sup>-1</sup> MS) ± écart-type	Melon	Riesling	Gewurztraminer	Carignan	Merlot	Pinot noir	Grenache	Chardonnay	Cinsault	Syrah	Gamay	Cabernet-Sauvignon	Chenin	Ugni blanc	Sauvignon
(+)-catéchine	715 ± 0,9	634 ± 53,7	1029 ± 285,6	1493 ± 109,5	804 ± 0,5	897 ± 133	1276 ± 9,5	1059 ± 24,5	562 ± 14,4	1186 ± 149	505 ± 2,4	836 ± 42	1170 ± 42,8	1313 ± 243,6	1005 ± 97,4
(-)-épicatéchine	495 ± 16,9	532 ± 11,1	729 ± 73,1	526 ± 59,4	689 ± 47,9	601 ± 48,6	502 ± 10,9	560 ± 24,4	918 ± 83,2	578 ± 13,8	496 ± 55,5	401 ± 47,3	469 ± 35,4	532 ± 98,1	479 ± 32,4
trans-picéide	60 ± 7,1	61 ± 11,7	68 ± 3	26 ± 2,6	249 ± 6,6	115 ± 20,8	19 ± 2,4	43 ± 4,2	81 ± 9,9	52 ± 7,4	95 ± 9,2	29 ± 0,3	31 ± 6,9	33 ± 6,3	32 ± 4,5
ampélopsine A*	32 ± 0,3	82 ± 4,8	61 ± 10,4	80 ± 9	34 ± 1,8	57 ± 14,7	27 ± 2,8	80 ± 26,1	36 ± 1,1	23 ± 0,2	101 ± 18,5	26 ± 0,4	22 ± 5,3	49 ± 7,6	25 ± 1,8
trans-picéatannol	278 ± 33,1	239 ± 64,5	293 ± 72,8	149 ± 36,6	493 ± 67,7	662 ± 6,7	219 ± 73,5	119 ± 9,2	171 ± 13,9	136 ± 17,9	286 ± 15,1	390 ± 0,3	524 ± 93,9	473 ± 37	385 ± 42,7
trans-resvératrol	800 ± 41,5	575 ± 191,5	673 ± 206,5	596 ± 116,7	1075 ± 201,6	1420 ± 65,1	699 ± 174	353 ± 148	384 ± 28,1	339 ± 23,7	680 ± 59,7	1016 ± 14,5	932 ± 28,8	854 ± 83,7	816 ± 5,2
hopéaphénol	422 ± 23,9	306 ± 12,4	283 ± 8	418 ± 8,7	327 ± 83,2	348 ± 189,7	335 ± 175	211 ± 55,7	163 ± 59,9	131 ± 31,6	227 ± 38,4	281 ± 60	210 ± 31,1	195 ± 57,5	182 ± 25,9
isohopéaphénol	188 ± 28,5	503 ± 2,3	511 ± 18,3	400 ± 185,9	232 ± 19,5	601 ± 224	109 ± 96,9	288 ± 133,2	76 ± 85,3	80 ± 72,5	227 ± 21	599 ± 113,2	324 ± 66,4	287 ± 118,5	292 ± 40,5
ε-viniférine	508 ± 65,5	652 ± 156,8	1079 ± 126,4	304 ± 137,5	656 ± 357,3	1707 ± 88,7	485 ± 40,4	757 ± 299,4	453 ± 10,9	619 ± 111,6	576 ± 83,5	652 ± 18,5	1100 ± 95	784 ± 183,9	1094 ± 149
miyabénol C*	24 ± 0,7	26 ± 5,1	16 ± 0,1	27 ± 1,9	18 ± 1	30 ± 8,9	19 ± 6,7	16 ± 1,2	19 ± 3,1	18 ± 0,5	15 ± 0,4	24 ± 1,6	20 ± 2,5	19 ± 1,1	18 ± 0,9

Pour déterminer quelles molécules diffèrent significativement en fonction des individus, une analyse ANOVA (Kruskal-Wallis) a été réalisée, et les résultats sont présentés dans le Tableau XXVII. Excepté, pour l'hopéaphénol, les teneurs de ces molécules varient significativement selon les cépages.

**Tableau XXVII** : Effet du cépage sur la composition en polyphénols des sarments prélevés en 2011. L'analyse ANOVA de Kruskal-Wallis a permis de déterminer les valeurs H observées et les probabilités,  $p$ , associées. Les valeurs de  $p$  en rouge correspondent aux composés phénoliques dont les teneurs diffèrent significativement entre les cépages avec un risque d'erreur de 5%.

Molécules	H	$p$
(+)-catéchine	25,5	0,043
(-)-épicatéchine	26,9	0,029
<i>trans</i> -picéide	30	0,011
ampélopsine A	30	0,011
<i>trans</i> -picéatannol	29,5	0,014
<i>trans</i> -resvératrol	28,4	0,019
hopéaphénol	18,4	0,241
isohopéaphénol	27,5	0,025
$\epsilon$ -viniféine	26,7	0,031
miyabénol C	25,3	0,046

Les données du Tableau XXVII, hormis celles correspondant à l'hopéaphénol, ont été utilisées comme variables, dans une Analyse en Composante Principale (ACP).

Les résultats de cette ACP sont présentés dans les Figures 27 et 28. Les deux premières composantes principales rassemblent 64,95% de la variance totale. Le premier axe représente 41,23% de la variance totale et le deuxième 23,72%. Les teneurs en picéatannol, resvératrol, isohopéaphénol,  $\epsilon$ -viniférine, miyabénol C sont corrélées négativement à l'axe 1 et fortement dans le cas du resvératrol et du picéatannol. D'après la Figure 28, Les teneurs en catéchine sont positivement corrélée à l'axe 2 tandis que les teneurs en picéide et en épicatéchine sont négativement corrélée ce même axe. Les teneurs en ampélopsine n'étant corrélées ni à l'axe 1 ni à l'axe 2, cette variable a été exclue de l'ACP : cela ne modifie pas la projection des

individus, ni celle des variables mais permet d'augmenter le pourcentage de variance totale expliquée.

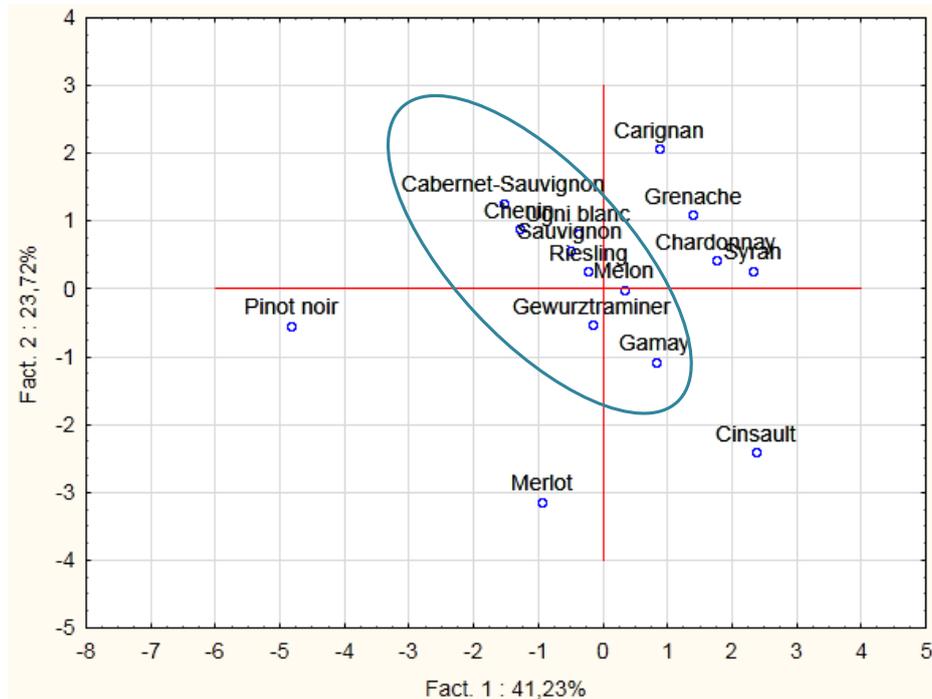
L'axe 1 pourrait représenter les teneurs en stilbènes et l'axe 2, les teneurs en flavan-3-ols, bien que le picéide soit aussi associé à cet axe.

Dans un premier temps, nous recherchons une éventuelle corrélation entre la teneur en polyphénols des sarments et le niveau de tolérance à l'esca ou à l'eutypiose (Figure 28). Dans la partie inférieure gauche du plan formé par les axes, deux cépages tolérants à l'eutypiose et à l'esca sont retrouvés : le Pinot noir et le Merlot. Ramassés au centre des axes, on retrouve les cépages sensibles à l'esca, mais pas forcément à l'eutypiose (Riesling, Melon, Gewurztraminer). Dans la partie droite du plan, on retrouve cinq cépages tolérants, à la fois à l'esca et à l'eutypiose. Ainsi les cépages sensibles à l'esca, au centre, ont pu être différenciés des cépages tolérants qui « gravitent » autour. Dans le cas de l'eutypiose, cette différence est moins marquée puisqu'au centre du plan sont regroupés des cépages à la fois sensibles et tolérants à l'eutypiose.

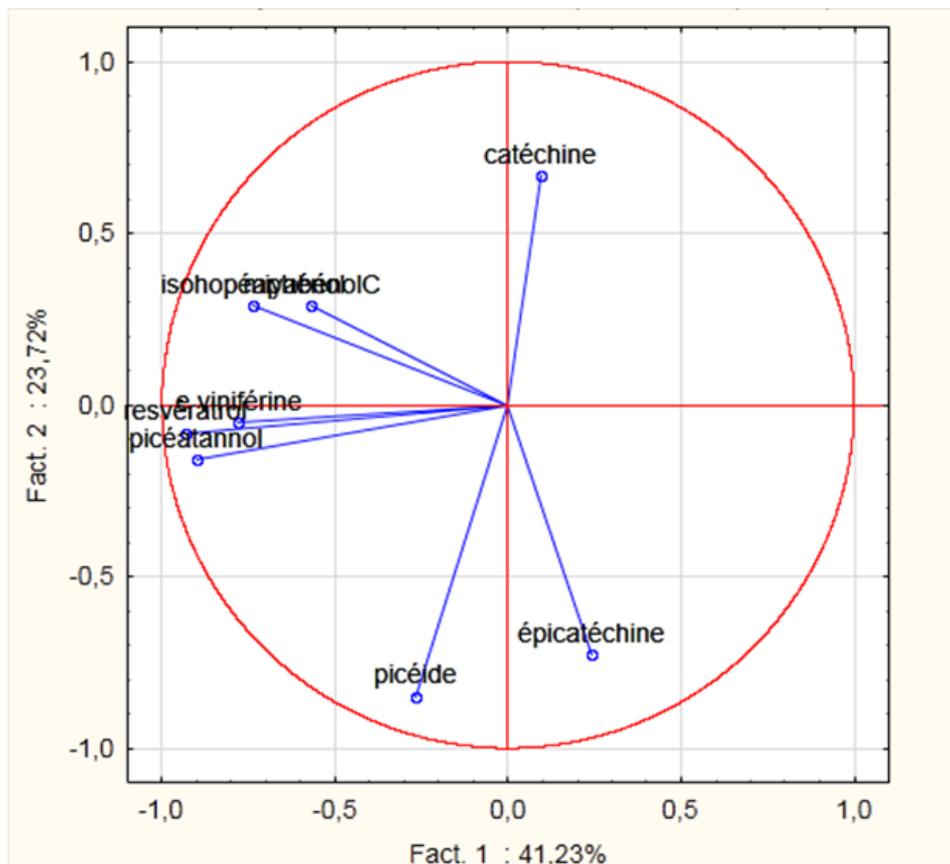
Néanmoins si cette différence existe, la tolérance ne semble pas s'expliquer par de fortes teneurs en stilbènes. En effet les cépages dits tolérants ont des profils polyphénoliques variables. Le Pinot noir et le Merlot dans une moindre mesure, se distinguent parmi les autres cépages par des concentrations élevées de stilbènes dans les sarments. Quant aux autres cépages tolérants à l'esca et à l'eutypiose (Carignan, Grenache, Chardonnay, Syrah et Cinsault) ils sont plutôt déterminés par de faibles teneurs en stilbènes par rapport aux cépages sensibles, et présentent dans le cas du Cinsault et du Carignan des teneurs élevées (-)-épicatechine et en (+)-catéchine respectivement.

Quant aux cépages sensibles et très sensibles comme le Chenin et l'Ugni blanc, leur caractéristique commune est de présenter des teneurs « moyennes » pour les composés phénoliques qui ont été quantifiés. C'est-à-dire que nos variables ne permettent pas de les discriminer.

Il est rappelé que ces données sont à prendre avec précaution car elles ne sont le résultat du suivi sur une année de récolte. C'est pourquoi nous avons procédé à l'analyse d'un deuxième prélèvement de sarments réalisés un an auparavant (paragraphe suivant).



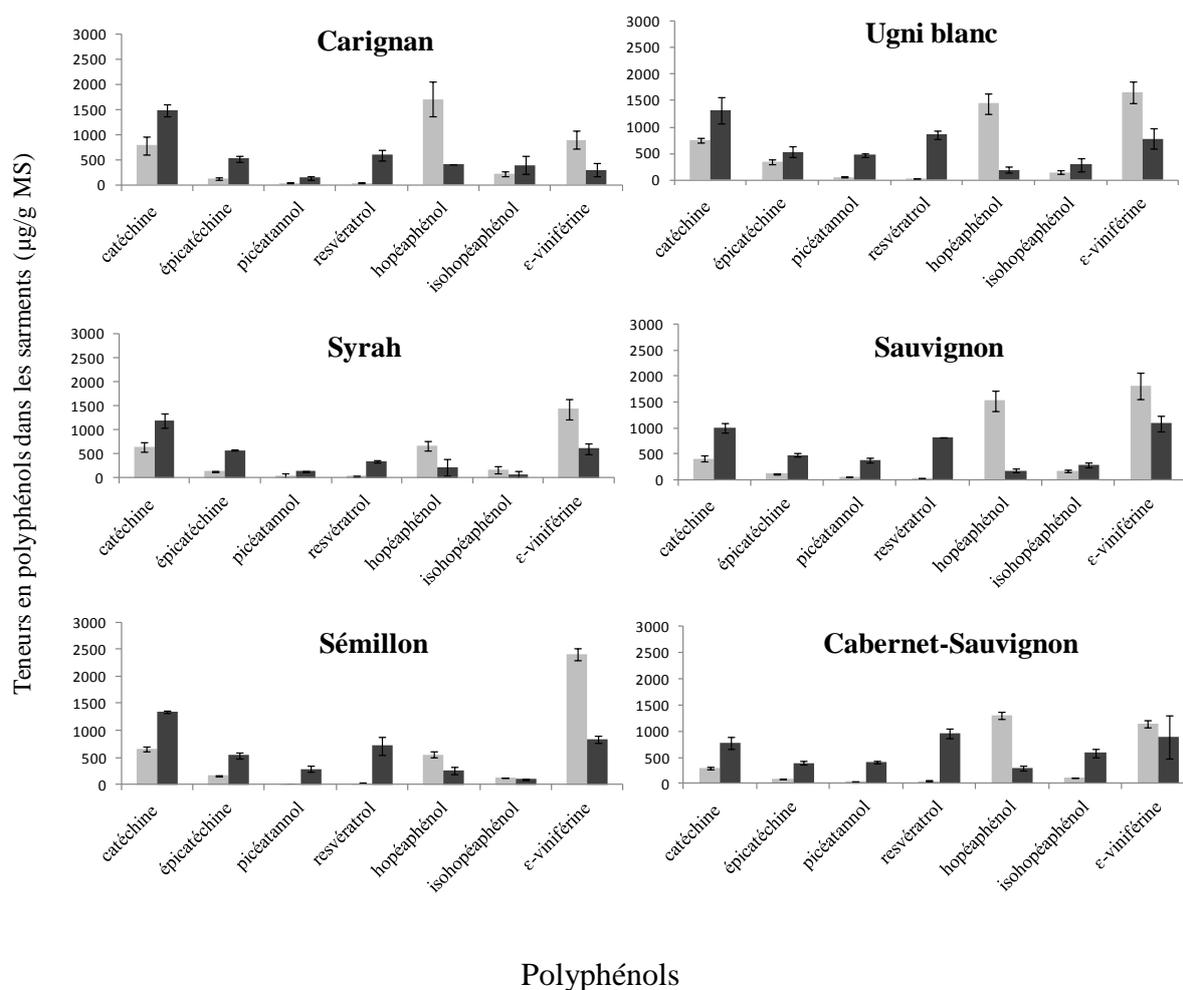
**Figure 27** : Projection des individus (les 15 cépages) sur les axes déterminés par l'ACP. Les cépages sensibles à l'esca sont entourés d'une ellipse grise.



**Figure 28** : Projection des variables (les 15 cépages) sur les axes déterminés par l'ACP.

## I.2. Comparaison des teneurs en polyphénols dans les sarments en 2010 et en 2011.

Pour que s'assurer que les composés phénoliques « constitutifs » des sarments puissent être un critère discriminant les cépages sensibles et tolérants il est important que les teneurs en polyphénols des bois d'un même cépage soient stables d'une année à l'autre ou du moins que ces teneurs évoluent dans le même sens. Pour vérifier cela, une comparaison des teneurs en polyphénols dans les sarments prélevés en janvier 2010 par rapport à celles de sarments prélevés en 2011 a été réalisée pour 6 cépages (Carignan, Ugni blanc, Syrah, Sauvignon, Sémillon et Cabernet-Sauvignon). Les résultats sont présentés pour quelques unes des molécules quantifiées dans la Figure 29.



**Figure 29** : Teneurs en polyphénols de sarments de Carignan, d'Ugni blanc, de Syrah, de Sauvignon, de Sémillon et de Cabernet-Sauvignon, prélevés en janvier 2010 (barres gris clairs) et janvier 2011 (barres gris foncé). Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  écart-type de dosages sur les sarments de 3 ceps.

Pour les trois cépages, on observe que les teneurs en catéchine, épicatechine, picéatannol et en resvératrol sont plus élevées en 2011 alors que les teneurs en hopéaphénol et en  $\epsilon$ -viniférine sont plus faibles, par rapport à 2010. Ces variations peuvent aller du simple au triple, comme c'est le pour les teneurs en  $\epsilon$ -viniférine chez le Sémillon

### I.3. Discussion

Certaines molécules constitutives des tissus végétaux peuvent agir en tant que barrière chimique contre les agresseurs. Les stilbènes des tissus ligneux de la vigne pourraient jouer ce rôle contre les agents de maladies du bois. Afin de tester cette hypothèse, un dosage de polyphénols dans les sarments « sains » de 15 cépages de tolérance variable à l'esca/BDA et à l'eutypiose, a été réalisé.

Au total, 11 molécules ont été quantifiées dans les sarments. Les molécules majoritaires sont la catéchine (0,5 à 1,5 mg/g MS), l'épicatechine (0,4 à 0,7 mg/g MS), le resvératrol (0,3 à 1,4 mg/g MS) et l' $\epsilon$ -viniférine (0,3 à 1,7 mg/g MS). Ces molécules avaient déjà été quantifiées dans le bois par d'autres auteurs (Roubelakis-Angelakis 2001, Pussä *et al.* 2006) et notre étude confirme l'ordre de grandeur de ces concentrations : 1,1 à 3,2 mg/g MS pour le resvératrol, 0,7 à 1,7 mg/g MS pour l' $\epsilon$ -viniférine, 0,6 à 1 mg/g MS pour l'épicatechine et 0,6 à 1,4 mg/g MS pour la catéchine.

En ce qui concerne l'ordre de grandeur des autres composés auparavant jamais quantifiés précisément, celui-ci est le suivant : *trans*-picéide 0,02 à 0,25 mg/g MS, picéatannol 0,12 à 0,66 mg/g MS, hopéaphénol 0,13 à 0,42 mg/g MS et isohopéaphénol 0,08 à 0,6 mg/g MS.

La comparaison des profils polyphénoliques des 15 cépages a permis de regrouper les cépages sensibles à l'esca et au BDA. En revanche un comportement commun aux cépages tolérants à l'esca/BDA et à l'eutypiose ainsi qu'aux cépages sensibles à l'eutypiose n'a pas pu être déterminé. Hormis le Pinot noir et le Merlot, aucun autre cépage dit tolérant ne présente des teneurs élevées en stilbènes, au contraire. D'autres part, les deux cépages très sensibles (Chenin et Ugni blanc) présentent des teneurs en stilbènes qui ne sont pas faibles. Dans notre

étude de cas, la tolérance, si elle est liée aux composés phénoliques, pourrait dépendre d'autres polyphénols que ceux que nous avons quantifiés.

D'autres hypothèses pouvant expliquer la tolérance de la vigne aux maladies du bois pourraient reposer sur des mécanismes comme :

- des polyphénols induits et non constitutifs
- une sensibilité moindre aux toxines produites par les champignons
- une meilleure capacité à renforcer les parois cellulaires par la synthèse de lignine par exemple
- une induction de réponses de défense autre que les polyphénols telle la capacité à induire des protéines PR plus précocément et plus intensément

Le fait que les cépages sensibles soient mieux discriminés par rapport à l'esca plutôt qu'à l'eutypiose pourrait aussi être expliqué par le fait que la tolérance à l'eutypiose repose sur d'autres composés phénoliques. En effet, alors que le rôle des stilbènes dans la relation hôte-parasites est suggéré par plusieurs auteurs pour l'esca (Mazullo 2000, Santos 2006, Martin 2009), peu de travaux sur ces composés, concernent l'eutypiose. Les travaux de thèse de Laurence Chapuis (1998) sur l'eutypiose ont montré que les teneurs en tanins proanthocyaniques et en composés phénoliques solubles totaux sont plus élevées dans le bois sains de cep Merlot (tolérant) que dans celui de l'Ugni blanc et du Cabernet-sauvignon (sensibles). Or en terme de stilbènes, nous n'observons pas de différences majeures entre le Merlot, l'Ugni blanc et le Cabernet-sauvignon à part dans le cas du *trans*-picéide de l'ishopéaphénol dont les teneurs sont respectivement plus élevées chez le Merlot et le Cabernet-Sauvignon. Il est donc probable que, si les polyphénols ont un rôle dans la relation vigne-*E. lata*, les stilbènes ne soient pas le bon discriminant.

Il est aussi possible que les polyphénols constitutifs des sarments ne soient pas le reflet de la tolérance ou de la sensibilité de la vigne à l'esca ou à l'eutypiose car ce matériel végétal semble fortement assujéti aux conditions environnementales. En effet, nos résultats ont montré une variabilité des teneurs en polyphénols dans les sarments entre 2010 et 2011. Le profil polyphénolique des sarments semble donc dépendre autant des conditions environnementales que du cépage et ne paraît pas adapté à une étude comparative. Toutefois

en 2010, seulement 6 cépages ont été suivis : il aurait été opportun d'avoir pu effectuer l'analyse sur les 15 mêmes cépages et surtout sur les cépages tolérants à l'esca/BDA tel le Pinot noir, le Merlot. Toutefois, les variations, diminutions ou augmentations en fonction des composés, vont dans le même sens pour tous les cépages. Ainsi il se peut qu'une comparaison tendrait aux mêmes résultats que ceux obtenus en 2011. De plus, l'hopéaphénol n'avait pas été utilisé comme variable dans notre ACP car sa valeur  $p$  ne permettait pas d'établir une différence significative entre les cépages avec un risque d'erreur de 5%.

Au regard d'autres études sur les composés phénoliques et la résistance des espèces ligneuses aux champignons, il semble difficile de corréler les teneurs en polyphénols constitutifs au niveau de résistance des arbres (Witzell & Martin2008).

En dernière remarque, il doit être précisé que certains ceps de la collection de l'INRA présentent des symptômes d'esca. L'étude de l'observatoire national des maladies du bois a montré que jusqu'à 80% des parcelles suivies sont atteintes par l'esca/BDA. Aussi il devient difficile de trouver des parcelles exemptes de maladie. Cependant les résultats du prochain chapitre montreront que même si nous avons pu prélever des sarments de plantes atteintes d'esca, cela n'a pas forcément eu d'impact sur les teneurs en polyphénols dans les sarments.

***En résumé, la différenciation entre cépages sensibles et cépages tolérants aux maladies du bois selon leur profil de teneurs en polyphénols dans les sarments est délicate. Toutefois, nous avons démontré que les cépages tolérants ne sont pas forcément plus riches en stilbènes que les cépages sensibles, au contraire. Il est possible que les teneurs en stilbènes des sarments ne soient pas les bons critères pour discriminer les cépages tolérants et que d'autres polyphénols ou d'autres mécanismes de défense soient à l'origine de leur tolérance.***

## II. Étude des polyphénols dans les sarments de plantes atteintes par l'esca

Après s'être intéressé aux polyphénols « constitutifs » des sarments, nous avons voulu suivre les profils polyphénoliques de sarments de plantes exprimant ou non des symptômes d'esca.

Une parcelle de Cabernet-Sauvignon du sud gironde, suivie depuis 5 ans pour l'expression des symptômes d'esca a été choisie. Cette parcelle a la particularité d'être divisée en deux zones de sol : une zone de graves où l'expression des symptômes et la vigueur sont faibles, et une zone d'argile où l'expression des symptômes et la vigueur sont plus fortes (Marrou *et al.* 2010). Cette parcelle est homogène en terme de port-greffe et de clone.

La détermination des polyphénols contenus dans les sarments de plantes n'ayant jamais exprimé de symptômes par rapport à ceux contenus dans des sarments de plantes ayant exprimé des symptômes au cours des 5 dernières années d'observation, devrait permettre de déterminer les polyphénols essentiels pour la plante pour lutter contre l'esca. De plus, l'hypothèse selon laquelle une vigueur faible favoriserait le métabolisme secondaire et donc la synthèse de composés de défense, pourra être testée en mettant en parallèle les résultats pour les deux types de sol.

Deux types de sarments ont été récoltés (janvier 2010) : les sarments de l'année (bois d'un an) et les sarments de l'année précédente (bois de deux ans) sur lesquels se sont formés les sarments de l'année. Cet échantillonnage devrait nous permettre de déterminer si les bois de deux ans sont plus riches en polyphénols et si les différences entre « sains » et « malades » sont plus marquées.

### II.1. Étude des teneurs en polyphénols

Les résultats des dosages des polyphénols dans les sarments (1 an et deux ans) sont présentés dans la Figure 30. Le miyabénol C et l'ampélopsine A n'ayant pas été quantifiés de manière absolue, les résultats de ces deux molécules ne sont pas présentés. Néanmoins une comparaison des teneurs relatives n'a pas montré de différences pour ces deux composés entre les différentes conditions.

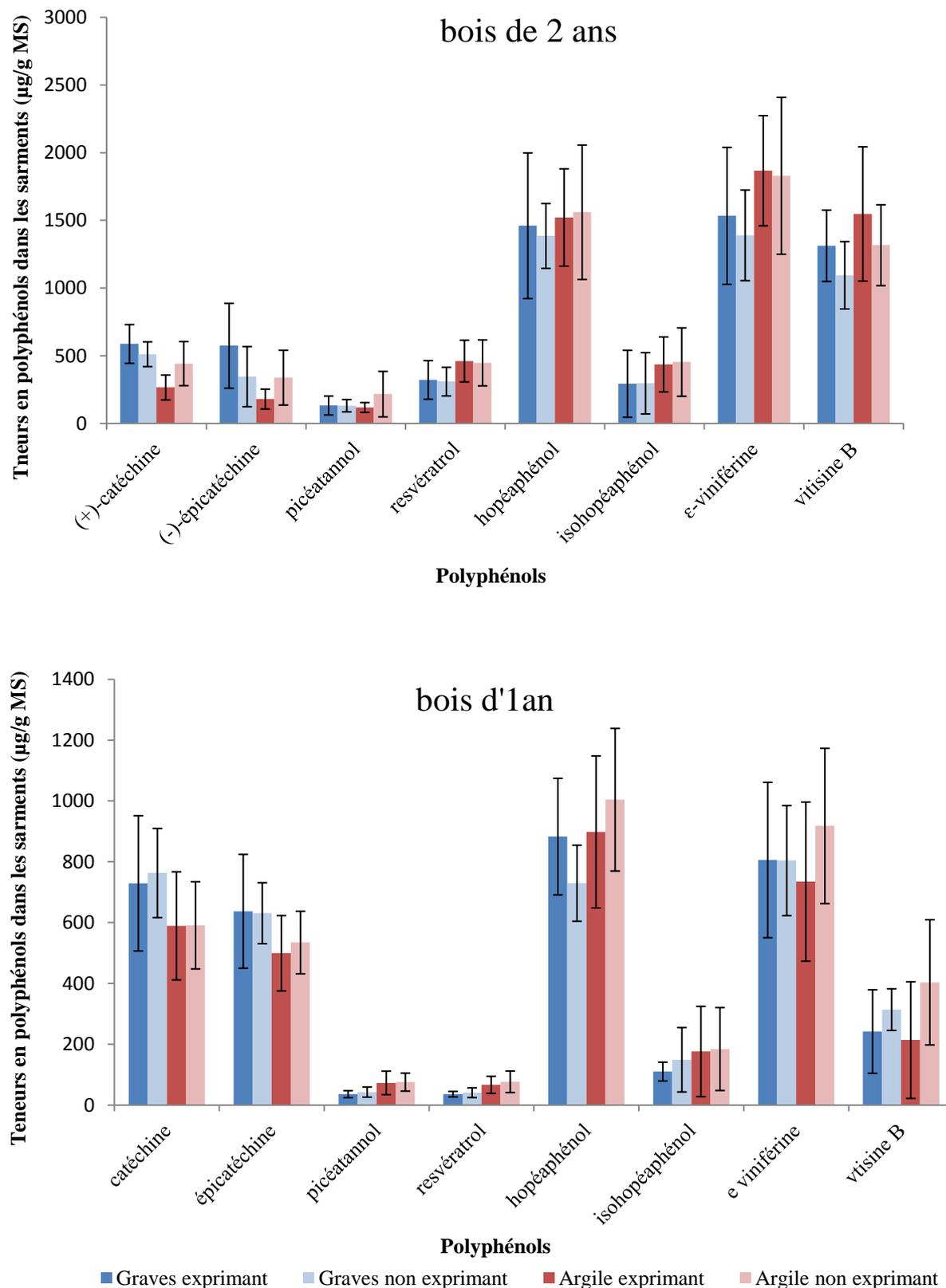
Par rapport aux dosages que nous avons effectués dans les sarments de Cabernet-Sauvignon dans la première partie de ce chapitre, des différences apparaissent : la vitisine B, l'hopéaphénol, et l' $\epsilon$ -viniférine sont en quantités plus importantes dans les sarments de la parcelle esca tandis que le *trans*-picéatannol, le *trans*-resvératrol et l'isohopéaphénol y sont retrouvés en quantités moindres.

Maintenant, comparons les teneurs en polyphénols au sein de la parcelle esca. Les teneurs en stilbènes sont plus élevées (environ 1,5-2 fois) dans les bois de deux ans que dans les bois d'un an, alors que les teneurs en catéchine et en épicatechine sont identiques voire inférieures. Les stilbènes majoritaires sont l'hopéaphénol, l' $\epsilon$ -viniférine et la vitisine B. Les écarts-types sont forts mais toutefois certaines tendances se dégagent : par exemple il semble que les flavan-3-ols soient en quantité plus importante dans les sarments de la zone graves que dans ceux de la zone argile.

Une analyse ANOVA (Kruskal-Wallis) est réalisée sur les données obtenues afin de déterminer si les quantités de certaines molécules diffèrent significativement entre les ceps « sains » et « malades » d'une même zone ou entre les ceps « sains » ou « malades » des deux zones.

Des différences entre ceps sains et ceps malades apparaissent au niveau des plants de la zone argileuse. Pour les bois d'un an, les quantités de vitisine B sont significativement supérieures dans les sarments argile non exprimant que dans les exprimant ( $p = 0,003$ ). Pour les bois de deux ans, ce sont la catéchine ( $p = 0,035$ ) et l'épicatechine ( $p = 0,046$ ) qui sont en quantités plus élevées dans les sarments argile non exprimant que dans les exprimant. Aucune différence significative n'a été relevée pour les autres polyphénols.

Un effet « sol » a également été observé. Dans les bois d'un an, des différences entre graves et argile non exprimant apparaissent pour quatre molécules : la catéchine ( $p = 0,035$ ) est en quantité plus importante sur le sol graves tandis que les teneurs en picéatannol ( $p = 0,005$ ), en resvératrol ( $p = 0,0012$ ) et en hopéaphénol ( $p = 0,0018$ ) sont supérieures dans la zone argileuse. Les différences entre graves et argile exprimant se situent au niveau des teneurs en épicatechine ( $p = 0,0017$ ), en picéatannol ( $p = 0,009$ ) et en resvératrol ( $p = 0,01$ ) avec à nouveau la même tendance : la zone de graves est plus riche en flavan-3-ols et la zone d'argile est plus riche en stilbènes. Pour les bois de deux ans, cet effet sol n'est retrouvé qu'entre les ceps argile et graves exprimant des symptômes et ce au niveau des teneurs en catéchine ( $p = 0,0002$ ) et en épicatechine ( $p = 0,0001$ ), encore une fois plus élevées dans la zone de graves.



**Figure 30** : Teneurs en polyphénols dans les sarments d'un an et de deux ans de ceps de la zone de graves et d'argile ayant exprimé des symptômes d'esca chaque année ces 5 dernières années (exprimant) et n'ayant pas exprimé de symptômes depuis 5 ans (non exprimant). Les résultats représentent les moyennes des 10 à 20 ceps prélevés sur chaque zone et par condition d'expression ± écart-type. L'effet sol est plus marqué que l'effet « esca ».

L'hypothèse selon laquelle, dans la zone de graves qui est un sol à faible réserve utile, le métabolisme de la plante serait tourné vers le métabolisme secondaire n'est pas complètement vérifiée. Il semble que l'influence du sol ne soit pas univoque sur tous les métabolites secondaires puisque les teneurs en flavan-3-ols sont plus élevées dans les sarments « graves » et que les teneurs en stilbènes sont plus élevées dans la zone « argile ».

## **II.2. Discussion**

L'objectif de cette troisième partie était de déterminer l'influence de l'esca sur les teneurs en polyphénols dans les sarments. Nous disposions d'une parcelle présentant deux types de sol : le premier (zone de graves) conférant une faible vigueur à la vigne et pour lequel le pourcentage de plantes exprimant des symptômes d'esca est faible, le second (zone argileuse) conférant une forte vigueur et pour lequel le pourcentage de plantes exprimant des symptômes est élevé.

Des différences entre ceps exprimant des symptômes et ceps n'exprimant pas de symptômes ont été observées uniquement sur la zone d'argile. La vitisine B, la catéchine et l'épicatéchine sont en quantités supérieures dans les sarments de ceps ne présentant pas de symptômes. L'analyse des ceps exprimant semble montrer que la plante ne répond pas par une production plus intense d'un quelconque polyphénol afin de lutter contre l'esca. Au contraire, les teneurs plus élevées en polyphénols (notamment vitisine B, catéchine et épicatéchine) sont observées dans les vignes apparemment saines. Ces molécules seraient-elles responsables d'une sensibilité moindre à l'esca?

Au niveau de la comparaison zone de graves et zone d'argile, il était attendu de plus fortes teneurs en polyphénols dans les sarments de la zone de graves que dans ceux de la zone d'argile. En effet, il est connu que sur les sols à faibles réserves utiles, comme notre zone de graves, le métabolisme des plantes favorise la synthèse des métabolites secondaires. Le taux d'expression des symptômes d'esca étant plus faible sur la zone de graves que sur la zone d'argile, l'hypothèse avait été émise que les ceps « graves » synthétiseraient plus de composés

phénoliques et seraient ainsi plus tolérant à l'esca. Or, certaines molécules sont plus abondantes dans les sarments de la zone de graves comme la catéchine et d'autres sont plus abondantes dans les sarments de la zone d'argile comme le picéatannol. Si l'effet du sol sur les teneurs en polyphénols est avéré, nous n'avons pas pu mettre en évidence une plus forte de synthèse de polyphénols, parmi ceux dosés, dans les ceps de la zone de graves en particulier.

*En résumé, la comparaison des teneurs en polyphénols dans les sarments « sains » et « malades » n'a pas permis de mettre en évidence des différences nettes. Néanmoins une tendance se dessine : il semblerait que les sarments de plantes apparemment saines soient un peu plus riches en catéchine, épicatechine ou vitisine B. L'effet du sol a été montré sur les teneurs en polyphénols. Toutefois celui-ci diffère selon les molécules.*

### III. Conclusion

L'objectif de ce chapitre de déterminer les concentrations des polyphénols identifiés dans le chapitre 1 (la (+)-catéchine, la (-)-épicatechine, le *trans*-picéide, le *trans*-picéatannol, le *trans*-resvératrol, l' $\epsilon$ -viniférine, l'ampélopsine A, l'hopéaphénol, l'isohopéaphénol, le miyabénol C et la vitisine B), d'une part dans des plantes saines, en tant que molécules constitutives, puis dans des plantes atteintes par l'esca, en tant que composés de défense essentiels à la lutte contre ces maladies.

Le dosage de ces composés dans les sarments nous a permis de voir qu'en fonction du cépage, du sol et de l'année, les teneurs en polyphénols varient de manière plus ou moins importante. Pour exemple, des différences ont été remarquées pour certains composés dans les sarments de la collection en 2010 et 2011, de même que dans les sarments de la parcelle atteintes par l'esca ou provenant d'un sol graveleux ou argileux.

Au cours de l'étude des 15 cépages de sensibilité différente aux maladies du bois, nous avons pu difficilement différencier les cépages sensibles des cépages tolérants aux maladies du bois selon leur teneur en polyphénols dans les sarments. Néanmoins, nous avons démontré que les

cépages tolérants ne sont pas forcément plus riches en stilbènes que les cépages sensibles, au contraire.

La comparaison des teneurs en polyphénols dans les sarments « sains » et « malades » n'a pas non plus permis de mettre en évidence des différences franches. Néanmoins il semblerait que les sarments de plantes apparemment saines soient un peu plus riches en catéchine, épicatechine ou vitisine B. Il est connu que les teneurs en resvératrol et en  $\epsilon$ -viniférine sont élevées au niveau des nécroses engendrées par les champignons dans le cep (Amalfitano 2000.). Le fait que nous n'ayons pas mis en évidence une forte augmentation des polyphénols dans les sarments des ceps « malades » suggère que cette induction est trop localisée pour être détectée dans la masse de sarments extraits.

Au bilan, que ce soit l'étude sur les polyphénols « constitutifs » ou celle sur les polyphénols induits par la plante pour lutter contre les maladies du bois, aucune ne nous a permis de mettre clairement en évidence que les stilbènes sont impliqués ici dans les défenses de la vigne. De plus, la forte variabilité associée aux teneurs en polyphénols dans les sarments suggère que ce matériel pourrait ne pas être adapté au type d'étude que nous avons mené. Enfin, nous n'avons pu mener ces suivis que sur une année et il aurait été intéressant de pouvoir comparer ces résultats avec un nouveau prélèvement.



# CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

---

Depuis une trentaine d'années, une recrudescence des maladies du bois de la vigne, eutypiose, syndrome de l'esca, est observée dans tous les pays producteurs de vin. Ces affections vasculaires sont causées par des champignons capables de se développer dans le xylème et de produire des nécroses importantes dans les tissus ligneux. Elles sont préoccupantes puisqu'aucune solution curative n'est aujourd'hui disponible et que les plantes atteintes ne seront plus productives pour la plupart d'entre elles. Ces maladies sont complexes du fait de la mise en cause de plusieurs agents pathogènes (esca), de leur internalisation et de l'expression erratique des symptômes. La compréhension des relations hôte-parasite(s) est un enjeu majeur car elle pourrait permettre de développer de nouvelles stratégies de lutte.

Deux arguments plaident en la faveur de l'induction de mécanismes de défense contre les agents de maladies du bois :

- d'une part, l'existence d'une phase de latence pouvant atteindre plusieurs années avant l'apparition des symptômes
- d'autre part, l'observation d'une variation importante de l'incidence des maladies du bois en fonction des cépages, suggérant que certains sont plus tolérants que d'autres.

L'identification de ces mécanismes de tolérance (puisque aucune résistance aux maladies du bois n'est connue) fait l'objet de recherches.

Les stilbènes sont connus chez la vigne depuis de nombreuses années pour leur rôle dans les défenses de la plante contre les agents pathogènes fongiques (Langcake 1977). La biosynthèse du resvératrol, l'unité de base des stilbènes, du ptérostilbène et de l' $\epsilon$ -viniférine est induite par l'attaque du mildiou, de l'oïdium, de la pourriture grise, dans les feuilles ou les baies (Langcake & Pryce 1976, Dercks & Creasy 1990, Pezet *et al.* 2004, Schnee *et al.* 2008)

et l'accumulation des stilbènes est corrélée positivement à la résistance des cépages à ces maladies.

Aussi il paraissait opportun de rechercher du côté des stilbènes pour expliquer la tolérance de la vigne aux maladies du bois. Avant de commencer ce travail, il était connu que :

- les teneurs en resvératrol et en  $\epsilon$ -viniférine et en oligomères de resvératrol sont plus importantes dans les zones nécrosées de ceps infectés par l'esca (Amalfitano *et al.* 2000, 2005, 2011) et l'eutypiose (Chapuis 1995)
- l'inoculation par un agent de l'esca (*P. chlamydospora*) entraîne une augmentation de la synthèse de resvératrol et d' $\epsilon$ -viniférine dans le bois de boutures (Martin *et al.* 2009)
- quelques exemples montrent des corrélations entre teneurs en stilbènes induits au niveau des nécroses et tolérance/sensibilité des cépages
- le resvératrol et le ptérostilbène inhibent la croissance d'agents de l'esca et de l'eutypiose

L'objectif de ce travail était donc d'apporter de nouvelles informations concernant le rôle potentiel des stilbènes dans les défenses de la vigne contre les maladies du bois. Notamment nous souhaitions : (i) identifier les stilbènes majoritaires des tissus ligneux afin de (ii) tester leur activité antifongique *in vitro*, (iii) vérifier que les stilbènes présentant une activité antifongique sont induits par des agents de maladie du bois sur des modèles et en plein champ et (iv) comparer les teneurs en stilbènes « constitutifs » et induits par les maladies du bois et vérifier si celles-ci sont corrélées positivement à la tolérance de la vigne à ces maladies.

Pour cela nous avons choisi de travailler avec deux types de matériel végétal : les boutures foliaires et les sarments. En effet, les sarments sont des tissus ligneux de la vigne plus faciles à obtenir que les ceps.

La mise en œuvre de deux méthodes de couplage, la LC-NMR et la LC-MS, nous a permis d'identifier 11 polyphénols dont 9 stilbènes dans les sarments de la vigne : la (+)-catéchine, la (-)-épicatechine, le *trans*-picéide, le *trans*-picéatannol, le *trans*-resvératrol, l' $\epsilon$ -viniférine l'ampélopsine A, le miyabénol C, l'hopéaphénol, l'isohopéaphénol et la vitisine B. Ce résultat confirme des travaux antérieurs reportant déjà l'identification de ces composés chez *V. vinifera*. Le dosage de ces composés phénoliques, que nous avons réalisé à partir des sarments

de Cabernet-Sauvignon, a montré que nos résultats sont cohérents avec ceux rapportés dans la littérature pour les composés qui avaient déjà été quantifiés dans les sarments.

Puis nous avons cherché à déterminer quels composés phénoliques parmi ceux identifiés dans le bois de vigne présentent l'activité antifongique la plus marquée. Les stilbènes sont les molécules les plus aptes à inhiber la croissance des agents responsables des maladies du bois, *in vitro*. Les oligomères de resvératrol sont particulièrement efficaces et leur activité semble augmenter avec le nombre d'unités resvératrol qui les composent. Les champignons pionniers de l'esca, *P. chlamydospora*, *P. aleophilum* et *F. mediterranea*, ont montré leur capacité à croître dans un milieu riche en polyphénol. Le caractère pionnier de ces champignons réside sûrement, pour partie, dans leur tolérance aux composés phénoliques. Par contre nous avons montré de manière innovante que les Botryosphaeriaceae forment une famille particulièrement sensible à l'effet inhibiteur des composés phénoliques. Nous avons pu montrer que la tolérance ou la sensibilité aux composés phénoliques a tendance à caractériser les individus d'un même genre. Par ailleurs, un parallèle a pu être établi entre l'agressivité des souches (Laveau 2009) et leur sensibilité aux stilbènes : les espèces du genre *Neofusicoccum*, agressives, sont peu sensibles aux stilbènes tandis que les espèces du genre *Diplodia* sont moins agressives et plus sensibles aux stilbènes.

Nous avons d'ailleurs pu montrer que les oligomères (l'ampélopsine A, l' $\epsilon$ -viniférine, le miyabénol C, deux trimères inconnus, l'hopéaphénol et l'isohopéaphénol) sont induits dans des boutures infectées par le Botryosphaeriaceae, *Neofusicoccum parvum* mais pas dans celles infectées par *Diplodia seriata*. Or, pour rappel, *N. parvum* est un champignon agressif qui cause de larges nécroses dans le bois alors que *D. seriata*, peu agressif, ne provoque pas de nécroses visibles. Ainsi il se peut que la plante tente de lutter par les armes qu'elle suppose adaptées, les stilbènes oligomériques, mais qu'un champignon insensible à ces polyphénols, malgré leur concentration élevée, puisse se développer.

La comparaison des réponses de défense de boutures de cépages de sensibilité variable à l'esca a montré que les deux cépages tolérants (Carignan et Merlot) réagissent de manière similaire à l'élicitation. Ils induisent plus fortement et/ou plus précocement leurs défenses que le cépage sensible (Cabernet-Sauvignon) : ils accumulent davantage de stilbènes dans les feuilles tout comme ils induisent plus fortement l'expression des gènes de la voie de biosynthèse des stilbènes et de certains gènes codant des protéines PR. Ainsi les polyphénols pourraient jouer un rôle dans la tolérance aux maladies du bois lors des phases précoces de

l'interaction : lors d'une attaque par un agent pathogène, les plantes tolérantes induiraient leurs défenses, et en particulier la synthèse des polyphénols, et empêcheraient ainsi le champignon de se développer. Il reste à confirmer que le comportement des cépages que nous observé au niveau des feuilles est le même dans le bois et que cela se vérifie chez d'autres cépages tolérants et sensibles. Par exemple, 4 cépages, 2 tolérants et 2 sensibles, sous forme de boutures herbacées pourraient être inoculés, au niveau de la zone ligneuse par chacun des 6 agents suivis pour les essais antifongiques. Les teneurs en stilbènes pourraient être évaluées au niveau des nécroses et un suivi pourrait être également réalisé au niveau des feuilles.

En revanche la comparaison des teneurs en stilbènes « constitutifs » dans les sarments de 15 cépages n'a pas permis de différencier clairement les cépages sensibles des cépages tolérants aux maladies du bois. Néanmoins, nous avons démontré que les cépages tolérants ne sont pas forcément plus riches en stilbènes que les cépages sensibles, au contraire (sauf Pinot Noir). Ces observations ont amené de nombreuses questions. La première est la suivante : Notre matériel végétal est-il adapté à cette étude ? En effet le dosage des composés phénoliques dans les sarments nous a permis de voir qu'en fonction du cépage, de l'âge des sarments, du sol et de l'année les teneurs en polyphénols varient significativement. D'autre part, le prélèvement des sarments au mois de janvier ne nous permet de connaître les teneurs en stilbènes qu'au moment de la reprise de l'activité végétative de la plante alors que ces teneurs varient probablement dans les sarments tout au long du cycle végétatif. Il serait donc opportun de quantifier les stilbènes dans des sarments prélevés tout au long du cycle annuel de la vigne.

Dans le cas où notre modèle (sarments prélevés en janvier) serait adapté, alors : Est-ce que la distinction entre cépages tolérants et sensibles ne peut se faire qu'avec la différence observée au niveau des stilbènes « induits précocement » ? D'autres composés (tanins), d'autres mécanismes de défense (dépôt plus important de lignine dans les parois), qui expliqueraient la tolérance, sont-ils mis en jeu ?

La comparaison des teneurs en polyphénols dans les sarments « sains » et « malades » n'a pas non plus permis de mettre en évidence des différences franches. Si aucune différence n'apparaît au niveau des sarments, on peut émettre des hypothèses similaires à celles développées pour l'étude des sarments de 15 cépages. Notre matériel végétal est-il adapté ? En effet, même si les agents pathogènes se sont développés dans les sarments, l'induction des polyphénols est sans doute très localisée et cette réponse a été noyée dans la masse de

sarments récoltés. D'autres questions sont amenées : les stilbènes sont-ils les bons marqueurs ? Sont-ils dégradés par les agents pathogènes ?

Au bilan, notre étude a apporté plusieurs informations nouvelles :

- les oligomères de resvératrol présents dans les tissus ligneux de la vigne sont des stilbènes particulièrement actifs en terme d'inhibition de la croissance mycélienne et à des concentrations semblables à leurs teneurs *in planta*
- les champignons pionniers de l'esca sont peu sensibles aux polyphénols
- les Botryosphaeriaceae sont des champignons sensibles aux polyphénols et leur niveau de sensibilité pourrait être genre-dépendant
- des oligomères de resvératrol sont induits lors d'une infection et ce phénomène semble spécifique puisqu'il diffère selon que l'espèce inoculée est sensible ou tolérante aux stilbènes
- les teneurs en polyphénols « constitutifs » des sarments ne semblent pas être un critère permettant de discriminer les cépages sensibles et tolérants ou les plantes « saines » ou « malades »

Si nos résultats concourent à montrer que les stilbènes sont fongistatiques et induits par les agents de maladies du bois, ou par les molécules qu'ils produisent, leur efficacité semble fortement dépendante de l'identité des champignons agresseurs. Le fait que les champignons pionniers de l'esca soient peu voire pas sensibles à l'activité inhibitrice des stilbènes suggère que ces composés ne seront pas capables d'endiguer longtemps le développement de la maladie : c'est peut-être une partie de l'explication au fait qu'il n'existe pas de cépage résistant.

De nombreuses questions restent en suspens et différents prolongements peuvent être envisagés.

L'étude des stilbènes des tissus ligneux pourrait être complétée par le dosage de ces composés dans le bois du cep. D'une part les ceps sont le lieu de développement des agents de maladies du bois. D'autre part, nous avons observé que les sarments de 2 ans sont bien plus riches en polyphénols que les bois d'un an. Il est donc fort probable que les teneurs en stilbènes soient plus élevées dans les ceps et que d'autres stilbènes y soient synthétisés.

Il serait intéressant de poursuivre la comparaison des défenses induites entre cépages tolérants et sensibles sur des boutures non pas élicitées mais inoculées au niveau du bois par chacun des six agents que nous avons testés lors des essais antifongiques. En effet, notre suivi des défenses dans les feuilles, bien qu'il soit cohérent dans le contexte de l'esca, ne reflète peut être pas ce qui se passe dans le bois. L'analyse des réponses de défenses dans les tissus ligneux permettrait de se rapprocher davantage de ce qui se produit au vignoble. D'avantage de cépages tolérants et sensibles pourraient être inclus dans cet essai afin de confirmer ou d'infirmer que la tolérance des cépages dits tolérants repose sur la production de stilbènes. De plus, l'inoculation de boutures par les champignons que nous avons testés dans les essais antifongiques nous permettrait de vérifier que leur sensibilité ou tolérance aux stilbènes est corrélée avec leur capacité à se développer dans le bois. Car si cela s'avérait juste, les essais de croissance sur milieu gélosé supplémenté en stilbènes pourraient être une nouvelle façon d'évaluer le niveau de pathogénicité des agents responsables de maladies du bois.

Un autre travail intéressant à mener serait de localiser les stilbènes au niveau tissulaire voire cellulaire dans les boutures infectées. En effet, la démonstration que les stilbènes sont induits au site d'inoculation serait une preuve supplémentaire de la spécificité de cette réaction de défense. L'utilisation de la microscopie confocale à balayage laser permettrait notamment grâce à l'autofluorescence des stilbènes de reconstruire des images 3D de la répartition des stilbènes au niveau des nécroses. Une colocalisation avec l'agent pathogène serait également possible.

Pour finir, d'autres composés phénoliques pourraient être impliqués dans les réactions de défenses de la vigne contre les agents des maladies du bois. Il serait donc approprié de déterminer les teneurs en tanins proanthocyaniques par exemple, qui sont présents en plus grande quantité dans les nécroses dues à *E. lata* (Chapuis 1995).

# Références bibliographiques

---

- Abou-Mansour, A., Couché, E. & Tabacchi, R., 2004. Do fungal naphthalenones have a role in the development of esca symptoms? *Phytopathologia Mediterranea*, 43(1), p.75–82.
- Abou-Mansour, E., Polier, J., Pezet, R. & Tabacchi, R., 2009. Purification and partial characterisation of a 60 kDa laccase from *Fomitiporia mediterranea*. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(3), p.447–453.
- Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J., Weston, L. A. & Bessis, R. 1997. Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *Journal of Chemical Ecology*, 23(7), p.1689–1702.
- Adrian, M., Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.C., Tesson, L. & Bessis, R., 2000. Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), p.6103-6105.
- Afifi, M., El Kereamy, A., Legrand, V., Chervin, C., Monje, M. C., Nepveu, F. & Roustan, J. P., 2003. Control of anthocyanin biosynthesis pathway gene expression by eutypine, a toxin from *Eutypa lata*, in grape cell tissue cultures. *Journal of Plant Physiology*, 160, p.971-975.
- Agrelli, D., Amalfitano, C., Conte, P. & Mugnai, L., 2009. Chemical and spectroscopic characteristics of the wood of *Vitis vinifera* cv. Sangiovese affected by esca disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(24), p.11469–11475.
- Aguero, C.B., Thorne, E. T., Ibanez, A. M., Gubler, W. D. & Dandekar, A. M., 2008. Xylem sap proteins from *Vitis vinifera* L. Chardonnay. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59(3), p.306.
- Alfonzo, A., Conigliaro, G., Torta, L., Burruano, S. & Moschetti, G., 2009. Antagonism of *Bacillus subtilis* strain AG1 against vine wood fungal pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(1), p.155–158.
- Alonso-Villaverde, V., Voinesco, F., Viret, O., Spring, J. L. & Gindro, K., 2010. The effectiveness of stilbenes in resistant Vitaceae: Ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. *Plant Physiology and Biochemistry*.
- Amalfitano, C., Evidente, A., Surico, G., Tegli, S., Bertelli, E. & Mugnai, L., 2000. Phenols and stilbene polyphenols in the wood of esca-diseased grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 39(1), p.178–183.
- Amalfitano, C., Peduto, F., Mugnai, L., Evidente, A. & Surico, G., 2005. Chemical characterisation of stilbenic polyphenols from esca-diseased wood and their role in defense mechanisms. 4<sup>th</sup> international workshop on grapevine trunk diseases, *Phytopathologia Mediterranea*, 44, p.99.
- Amalfitano, C., Agrelli, D., Arrigo, A., Mugnai, L., Surico, G. & Evidente, A., 2011. Stilbene polyphenols in the brown red wood of *Vitis vinifera* cv. Sangiovese affected by esca proper. *Phytopathologia Mediterranea*, 50, supplement.

- Amborabé, B.E., Fleurat-Lessard, P., Bonmort, J., Roustan, J.P. & Roblin, G., 2001. Effects of eutypine, a toxin from *Eutypa lata*, on plant cell plasma membrane: possible subsequent implication in disease development. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(1), p.51–58.
- Amborabé, B.E., Fleurat-Lessard, P., Chollet, J. F. & Roblin, G., 2002. Antifungal effects of salicylic acid and other benzoic acid derivatives towards *Eutypa lata*: structure-activity relationship. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(12), p.1051–1060.
- Amborabé, B.E., Octave, S. & Roblin, G., 2005. Influence of temperature and nutritional requirements for mycelial growth of *Eutypa lata*, a vineyard pathogenic fungus. *Comptes Rendus Biologies*, 328(3), p.263–270.
- Andreini, L., Viti, R. & Scalabrelli, G., 2010. Preliminary histological observations on grapevine affected by esca disease. *Central European Journal of Biology*, p.1–7.
- Andolfi, A., Mugnai, L., Luque, J., Surico, G., Cimmino, G. & Evidente, A., 2011. Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. *Toxins*, 3(12), P.1569-1605.
- Aroca, Á., Gramaje, D., Armengol, J., García-Jiménez, J. & Raposo, R., 2010. Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 126(2), p.165–174.
- Auger, J, Perez, I & Esterio, M., 2010. Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wood protectants against the main grapevine trunk disease pathogens in Chile. *Phytopathologia Mediterranea*, 49, p.103-133.
- Aziz, A., Gauthier, A., Bezier, A., Poinssot, B., Joubert, J.M., Pugin, A., Heyraud, A. & Baillieul, F., 2007. Elicitor and resistance-inducing activities of bêta-1, 4 cellodextrins in grapevine, comparison with bêta-1,3 glucans and alpha-1,4 oligogalacturonides. *Journal of Experimental Botany*, 58(6), p.1463-1472.
- Aziz, A., Heyraud, A. & Lambert, B., 2004. Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta*, 218(5), p.767–774.
- Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bézier, A., Lambert, B., Joubert, J.M. & Pugin, A., 2003. Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(12), p.1118–1128.
- Aziz, A., Trotel-Aziz, P., Dhuicq, L., Jeandet, P., Couderchet, M. & Vernet, G., 2006. Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. *Phytopathology*, 96(11), p.1188–1194.
- Baggiolini, M., 1952. Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. *Revue Romande d'Agriculture et d'Arboriculture*, 8(1), p.4-6.
- Barjot, C., Tournaire, M., Castagnino, C., Vigor, C., Vercauteren, J. & Rossi, J.F., 2007. Evaluation of antitumor effects of two vine stalk oligomers of resveratrol on a panel of lymphoid and myeloid cell lines: comparison with resveratrol. *Life sciences*, 81(23-24), p.1565–1574.

- Barka, E.A., Eullafroy, P., Clément, C. & Vernet, G., 2004. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reports*, 22(8), p.608–614.
- Barros, I.B., Daniel, J.F.S., Pinto, J.P., Rezende, M.I., Braz Fihlo, R. & Ferreira, D.T., 2011. Phytochemical and antifungal activity of anthraquinones and root and leaf extracts of *Coccoloba mollis* on phytopathogens. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(3), p.535–541.
- Bavaresco, L., Petegolli, D., Cantu, E., Fregoni, M., Chiusa, G. & Trevisan, M., 1997. Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea*. *Vitis*, 36(2), p.77-83.
- Bavaresco, L., Vezulli, S., Battilani, P., Giorni, P., Pietri, A. & Bertuzzi, T., 2002. The occurrence of the stilbene piceatannol in grapes. *Vitis*, 41(3), p.133-136.
- Belhadj, A., Saigne, C., Telef, N., Cluzet, S., Bouscaut, J., Corio-Costet, M.F. & Mérillon J.M., 2006. Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), p.9119–9125.
- Belhadj, A., Telef, N., Cluzet, S., Bouscaut, J., Corio-Costet, M.F. & Mérillon, J.M., 2008. Ethephon elicits protection against *Erysiphe necator* in grapevine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), p.5781–5787.
- Benhamou, N., 2009. La Résistance chez les Plantes. *Principes de la stratégie défensive et applications agronomiques*. Éditions TEC & DOC Lavoisier, Paris.
- Bergey, D.R., Orozco-Cardenas, M., De Moura, D. S. & Ryan, C. A., 1999. A wound-and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(4), p.1756.
- Bernard, A. & Mur, G., 1986. Les sites de présence de la souche des mycéliums d'*Eutypa lata*, agent causal de l'eutypiose. *Le Progrès Agricole et Viticole*, p.288-289.
- Bézier, A., Lambert, B. & Baillieul, F., 2002. Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 108(2), p.111–120.
- Bisson, J., Poupard, P., Pawlus, A.D., Pons, A., Darriet, P., Mérillon, J.M. & Waffo-Téguo, P., 2011. Development of hybrid elution systems for efficient purification of stilbenoids using centrifugal partition chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, p.6079-6084.
- Bobrowska-Hägerstrand, M., Lillas, M., Mrowczynska, L., Wrobel, A., Shirataki, Y., Motohashi, N. & Hägerstrand, H., 2006. Resveratrol oligomers are potent MRP1 transport inhibitors. *Anticancer Research*, 26(3A), p.2081.
- Boddy, L. & Rayner, A., 1983. Origins of decay in living deciduous trees: the role of moisture content and a re-appraisal of the expanded concept of tree decay. *New Phytologist*, p.623–641.
- Boukharta, M., Girardin, M. & Metche, M., 1996. Isolement et caractérisation du *trans*-resvératrol et de l'épsilon-viniferine à partir du sarment de vigne (*Vitis vinifera*). XVIIIe Journée Internationale du Groupe Polyphénols. *Polyphenol Communication*, 1, p.39-40.

- Breuil, A.C., Adrian, M., Pirio, N., Meunier, P., Bessis, R. & Jeandet, P., 1998. Metabolism of stilbene phytoalexins by *Botrytis cinerea*: 1. Characterization of a resveratrol dehydrodimer. *Tetrahedron Letters*, 39(7), p.537–540.
- Breuil, A.C., Jeandet, P., Adrian, M., Chopin, F., Pirio, N., Meunier, P. & Bessis, R., 1999. Characterization of a pterostilbene dehydrodimer produced by laccase of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 89(4), p.298–302.
- Brown-Rytlewski, D.E. & McManus, P.S., 2000. Virulence of *Botryosphaeria dothidea* and *Botryosphaeria obtusa* on apple and management of stem cankers with fungicides. *Plant Disease*, 84(9), p.1031–1037.
- Bruno, G. & Sparapano, L., 2006a. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: I. Characterization of secondary metabolites in culture media and host responses to the pathogens in calli. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69(4-6), p.209–223.
- Bruno, G. & Sparapano, L., 2006b. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: II. Characterization of biomolecules in xylem sap and leaves of healthy and diseased vines. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69(4-6), p.195–208.
- Bruno, G. & Sparapano, L., 2006c. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: III. Enzymes produced by the pathogens and their role in fungus-to-plant or in fungus-to-fungus interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69(4-6), p.182–194.
- Bruno, G. & Sparapano, L., 2007. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: V. Changes in the chemical and biological profile of xylem sap from diseased cv. Sangiovese vines. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(4-6), p.210–229.
- Bruno, G., Sparapano, L. & Graniti, A., 2007. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: IV. Diffusion through the xylem of metabolites produced by two tracheiphilous fungi in the woody tissue of grapevine leads to esca-like symptoms on leaves and berries. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(1-3), p.106–124.
- Bulcke, M., Bauw, G., Castresana, C., Van Montagu, M. & Vandekerckhove, J., 1989. Characterization of vacuolar and extracellular beta-(1, 3)-glucanases of tobacco: Evidence for a strictly compartmentalized plant defense system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(8), p.2673.
- Busam, G., Junghanns, K.T., Kneusel, R.E., Kassemeyer, H.H., Matern, U. & Freiburg, S.W., 1997a. Characterization and Expression of Caffeoyle-Coenzyme A 3-O-Methyltransferase Proposed for the Induced Resistance Response of *Vitis vinifera* L. *Plant Physiology*, 115, p.1039–1048.
- Busam, G., Kassemeyer, H.H. & Matern, U., 1997b. Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiology*, 115(3), p.1029.
- Calzarano, F., Amalfitano, C., Seghetti, L. & Cozzolino, V., 2009. Nutritional status of vines affected with esca proper. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(1), p.20–31.
- Calzarano, F., Cichelli, A. & Odoardi, M., 2001. Preliminary evaluation of variations in composition induced by esca on cv. Trebbiano d’Abruzzo grapes and wines. *Phytopathologia Mediterranea*, 40(3), p.443–448.

- Calzarano, F., Seghetti, L., Del Carlo, M. & Cichelli, A., 2004. Effect of esca on the quality of berries, musts and wines. *Phytopathologia Mediterranea*, 43(1), p.125–135.
- Campos, R., Nonogaki, H., Suslow, T. & Saltveit, M. E., 2004. Isolation and characterization of a wound inducible phenylalanine ammonia-lyase gene (LsPAL1) from Romaine lettuce leaves. *physiologia plantarum*, 121(3), p.429–438.
- Camps, C., Kappel, C., Lecomte, P., Léon, C., Gomès, E., Coutos-Thévenot, P. & Delrot, S., 2010. A transcriptomic study of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon) interaction with the vascular ascomycete fungus *Eutypa lata*. *Journal of experimental botany*, 61(6), p.1719.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S. and Dong, X., 1997. The arabidopsis NPR gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88(1), p.57-63.
- Carter, M., 1957. *Eutypa armeniaca* Hansf. & Carter, sp. nov., an airborne vascular pathogen of *Prunus armeniaca* L. in southern Australia. *Australian Journal of Botany*, 5(1), p.21–35.
- Carter, M. & Price, T., 1973. *Eutypa armeniaca* associated with vascular disease in grapevine and barberry. *Australasian Plant Pathology*, 2(4), p.27–27.
- Casagrande, K., Falginella, L., Castellarin, S. D., Testolin, R. & Di Gaspero, G., 2011. Defence responses in Rpv3-dependent resistance to grapevine downy mildew. *Planta*, p.1–13.
- Casieri, L., Hofstetter, V., Viret, O. & Gindro, K., 2009. Fungal communities living in the wood of different cultivars of young *Vitis vinifera* plants. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(1), p.73–83.
- Çetin, E.S., Altinöz, D., Tarçan, E. & Göktürk Baydar, N., 2011. Chemical composition of grape canes. *Industrial Crops and Products*, 34, p.994-998.
- Chapuis, Laurence, 1995. *L'eutypiose de la vigne : contribution à l'étude des relations hôte-parasite*. Thèse de l'Université Bordeaux II. 188p.
- Chiarappa, L., 1959. Wood decay of the grapevine and its relationship with black measles disease. *Phytopathology*, 49, p.510–519.
- Chong, J., Poutaraud, A. & Huguene, P., 2009. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*, 177(3), p.143–155.
- Christen, D., Schönmann, S., Jermini, M., Strassen, R.J. & Défago, G., 2007. Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by in situ chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, 60(3), p.504–514.
- Cichewicz, R.H., Kouzi, S.A. & Hamann, M.T., 2000. Dimerization of resveratrol by the grapevine pathogen *Botrytis cinerea*. *Journal of Natural Products*, 63(1), p.29–33.
- Cobos, R., Barreiro, C., Mateos, R. M. & Coque, J. J. R., 2010. Cytoplasmic-and extracellular-proteome analysis of *Diplodia seriata*: a phytopathogenic fungus involved in grapevine decline. *Proteome Science*, 8(1), p.46.

- Colrat, S., Deswarte, C., Latche, A., Kläebe, A., Bouzayen, M., Fallot, J. & Roustan, J.P., 1999. Enzymatic detoxification of eutypine, a toxin from *Eutypa lata*, by *Vitis vinifera* cells: partial purification of an NADPH-dependent aldehyde reductase. *Planta*, 207(4), p.544–550.
- Comménil, P., Belingheri, L., Audran, J., Collas, A. & Dehorter, B., 1996. Mise en évidence d'une activité anti-*botrytis* dans les cires épicuticulaires de jeunes baies de *Vitis vinifera*, variété Pinot noir. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 30, p.7-13.
- Conrath, U., Pieterse, C.M.J. & Mauch-Mani, B., 2002. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, 7(5), p.210–216.
- Conrath, U., Thulke, O., Katz, V., Schwindling, S. & Kohler, A. 2001. Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. *European Journal of Plant Pathology*, 107(1), p.113–119.
- Cook, B., Clay, R., Bergmann, C., Albersheim, P. & Darvill, A., 1999. Fungal polygalacturonases exhibit different substrate degradation patterns and differ in their susceptibilities to polygalacturonase-inhibiting proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(8), p.703–711.
- Corti, G., Cuniglio, R., Agrelli, A. & Ricci, F., 2007. Influence of soil factors on esca infection in a vineyard soil on pliocene deposits. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 38(5-6), p.661–678.
- Coutos-Thévenot, P., Poinssot, B., Bonomelli, A., Yean, H., Breda, C., Buffard, D., Esnault, R., Hain, R. & Boulay, M., 2001. *In vitro* tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter. *Journal of Experimental Botany*, 52(358), p.901.
- Creasy, L.L. & Coffee, M., 1988. Phytoalexin production potential of grape berries. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 113, p.230-234.
- Crous, P.W. & Gams, W., 2000. *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. *Phytopathologia Mediterranea*, 39(1), p.112–118.
- Crous, P.W., Gams, W., Wingfield, M. J. & Van Wyk, P., 1996. *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections. *Mycologia*, p.786–796.
- Crous, P.W., Swart, L. & Coertze, S., 2001. The effect of hot-water treatment on fungi occurring in apparently healthy grapevine cuttings. *Phytopathologia Mediterranea*, 40(3), p.464–466.
- Dai, G., H., Andary, C., Mondolot-Cosson, I. & Boubals, D., 1995. Histochemical responses of leaves of *in vitro* plantlets of *Vitis* spp. to infection with *Plasmopara viticola*. *Phytopathology*, 85, p.149-155.
- Darrietort, G. & Lecomte, P., 2007. Evaluation of a trunk injection technique to control grapevine wood diseases. *Phytopathologia Mediterranea*, 46(1), p.50–57.
- Delaunay, J.-C., Castagnino, C., Chèze, C. & Vercauteren, J., 2002. Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 964(1-2), p.123-128.

- Del Rio, J., Gonzalez, P., Fuster, M.D., Botia, J.M., Gomez, P., Frias, V. & Ortuno, A., 2001. Tylose formation and changes in phenolic compounds of grape roots infected with *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* species. *Phytopathologia Mediterranea*, 40(3), p.394–399.
- Del Río, J.A., Gomez, P., Baidez, A., Fuster, M.D., Ortuno, A. & Frias, V., 2004. Phenolic compounds have a role in the defence mechanism protecting grapevine against the fungi involved in Petri disease. *Phytopathologia Mediterranea*, 43(1), p.87–94.
- Derckel, J.P., Audran, J. C., Haye, B., Lambert, B. & Legendre, L., 1998. Characterization, induction by wounding and salicylic acid, and activity against *Botrytis cinerea* of chitinases and bêta-1,3-glucanases of ripening grape berries. *Physiologia Plantarum*, 104(1), p.56–64.
- Derckel, J.P., Baillieux, F., Manteau, S., Audran, J.C., Haye, B., Lambert, B. & Legendre, L., 1999. Differential induction of grapevine defenses by two strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 89(3), p.197–203.
- Dercks, W. & Creasy, L., 1989. The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 34(3), p.189–202.
- Dercks, W., Creasy, L. & Luczka-Bayles, C., 1995. Stilbene phytoalexins and disease resistance in *Vitis*, Ed.Marcel Dekker: New York.
- Deswarte, C., Eychenne, J., Davy de Virville, J., Roustan, J.P., Moreau, F. & Fallot, J., 1996. Protonophoric activity of eutypine, a toxine from *Eutypa lata*, in plant mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 334, p.200–205.
- Deytieux, C., Gény, L., Lapailierie, D., Claverol, S., Bonneu, M. & Donèche, B., 2007. Proteome analysis of grape skins during ripening. *Journal of Experimental Botany*, 58(7), p.1851.
- Díaz, G.A., Esterio, M. & Auger, J., 2009. Effects of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on grapevine rootstocks. *Ciencia e Investigación Agraria*, 36(3), p.381–390.
- Di Gaspero, G., Marconi, R., Cipriani, G. & Testolin, R., 2009. Localisation of NBS-LRR genes in the grape genome. *Acta Horticulturae*, 827, p.53–58.
- Di Marco, S., Mazullo, A., Calzarano, F. & Cesari, A., 2000. The control of esca: status and perspectives. *Phytopathologia Mediterranea*, 39(1), p.232–240.
- Dixon, R.A. & Paiva, N.L., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, 7(7), p.1085.
- Djoukeng, J.D., Polli, S., Larignon, P. & Abou-Mansour, E., 2009. Identification of phytotoxins from *Botryosphaeria obtusa*, a pathogen of black dead arm disease of grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 124(2), p.303–308.
- Douds Jr, D., Nagahashi, G. & Abney, G., 1996. The differential effects of cell wall-associated phenolics, cell walls, and cytosolic phenolics of host and non-host roots on the growth of two species of AM fungi. *New Phytologist*, 133(2), p.289–294.
- Dubos, B., 2002. Maladies cryptogamiques de la vigne : champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne [2e éd. rev. et augm.], Bordeaux: Éd. Féret.

- Dula, T., Kappes, E. M., Horvath, A. & Rabai, A., 2007. Preliminary trials on treatment of esca-infected grapevines with trunk injection of fungicides. *Phytopathologia Mediterranea*, 46(1), p.91–95.
- Edwards, J., Pascoe, I.G. & Salib, S., 2007. Impairment of grapevine xylem function by *Phaeomoniella chlamydospora* infection is due to more than physical blockage of vessels with 'goo'. *Phytopathologia Mediterranea*, 46(1), p.87–90.
- Eichhorn, K. & Lorenz, H., 1977. Phaenologische entwicklungsstadien der rebe. *Nachrbl. Dtsch. Pflanzenschutzd. (Braunschweig)*, 29, p.119-120.
- Eskalen, A. & Gubler, W.D., 2001. Association of Spores of *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium inflatipes*, and *Pm. aleophilum* with Grapevine Cordons in California. *Phytopathologia Mediterranea*, 40(3), p.429–431.
- Esquerré-Tugayé, M. & Mazau, D., 1974. Effect of a fungal disease on extensin, the plant cell wall glycoprotein. *Journal of Experimental Botany*, 25(3), p.509.
- Evidente, A., Sparapano, L., Andolfi, A. & Bruno, G., 2000. Two naphthalenone pentaketides isolated from liquid cultures of *Phaeoacremonium aleophilum*, a fungus associated with esca disease syndrome. *Phytopathologia Mediterranea*, 39, p.162–168.
- Ezzili, B., Darne, G. & Bejaoui, M., 1999. Mise au point d'une technique de production d'anthocyanes dans les feuilles de boutures à un oeil de Carignan (*Vitis vinifera* L.) cultivées au laboratoire. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 33(1), p.9-18.
- Faurie, B., Cluzet, S. & Mérillon, J.M., 2009. Implication of signaling pathways involving calcium, phosphorylation and active oxygen species in methyl jasmonate-induced defense responses in grapevine cell cultures. *Journal of Plant Physiology*, 166(17), p.1863–1877.
- Feliciano, A.J. & Gubler, W.D., 2001. Histological investigations on infection of grape roots and shoots by *Phaeoacremonium* spp. *Phytopathologia Mediterranea*, 40(3), p.387–393.
- Feliciano, A.J., Eskalen, A. & Gubler, W.D., 2004. Differential susceptibility of three grapevine cultivars to *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora* in California. *Phytopathologia Mediterranea*, 43(1), p.66–69.
- Ficke, A., Gadoury, D.M. & Seem, R.C., 2002. Ontogenic resistance and plant disease management: A case study of grape powdery mildew. *Phytopathology*, 92(6), p.671–675.
- Fischer, M. & Kassemeyer, H., 2003. *Fomitiporia mediterranea*, a new basidiomycete species associated with esca of grapevine in Europe: biology, ecology, and distribution. *Phytopathologia Mediterranea*, 43, p.144.
- Fischer, M., Farine, S., Chong, J., Guerlain, P. & Bertsch, C., 2009. The direct toxicity of BABA against grapevine ecosystem organisms. *Crop Protection*, 28(8), p.710-712.
- Fischer, R. & Hain, R., 1994. Plant disease resistance resulting from the expression of foreign phytoalexins. *Current Opinion in Biotechnology*, 5(2), p.125–130.
- Flor, H.H., 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9(1), p.275–296.

- Fornara, V., Lucchetta, M., Odorizzi, S., da Cunha, A. T. P. & Sella, L., 2008. Localization of stilbene synthase in *Vitis vinifera* L. during berry development. *Protoplasma*, 233(1), p.83–93.
- Fourie, P. & Halleen, F., 2006. Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 116(4), p.255–265.
- Fremont, L., 2000. Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*, 66(8), p.663–673.
- Fussler, L., Kobes, N., Bertrand, F., Maumy, M., Grosman, J. & Savary, S., 2008. A characterization of grapevine trunk diseases in France from data generated by the National Grapevine Wood Diseases Survey. *Phytopathology*, 98(5), p.571–579.
- Gabler, F.M., Smilanick, J. L., Mansour, M., Ramming, D. W. & Mackey, B. E., 2003. Correlations of morphological, anatomical, and chemical features of grape berries with resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 93(10), p.1263–1273.
- Gagné, S., 2007. Implication de l'équilibre hormonal dans les mécanismes de maturation phénolique du raisin: étude du rôle de l'acide abscissique sur la composition et la biosynthèse des tanins de la pellicule. Thèse de l'Université de Bordeaux. 215 p.
- Gianinazzi, S., Ahl, P., Cornu, A., Scalla, R. & Cassini, R., 1980. First report of host b-protein appearance in response to a fungal infection in tobacco. *Physiological Plant Pathology*, 16(3), p.337–342.
- Gindro, K., Pezet, R. & Viret, O., 2003. Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(9), p.846–853.
- Gindro, K., Spring, J., Pezet, R., Richter, H. & Viret, O., 2006. Histological and biochemical criteria for objective and early selection of grapevine cultivars resistant to *Plasmopara viticola*. *Vitis*, 45(4), p.191–196.
- Giribaldi, M., Perugini, I., Sauvage, F. X. & Schubert, A., 2007. Analysis of protein changes during grape berry ripening by 2-DE and MALDI-TOF. *Proteomics*, 7(17), p.3154–3170.
- Godard, S., Slacanin, I., Viret, O. & Gindro, K., 2009. Induction of defence mechanisms in grapevine leaves by emodin-and anthraquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(9), p.827–837.
- Godshall, M. & Lonergan, T., 1987. The effect of sugarcane extracts on the growth of the pathogenic fungus, *Colletotrichum falcatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 30(2), p.299–308.
- Goetz, G., Fkyerat, A., Métails, N., Kunz, M., Tabacchi, R., Pezet, R. & Pont, V., 1999. Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry*, 52(5), p.759–767.
- Gomès, E., Sagot, E., Gaillard, C., Laquitaine, L., Poinssot, B., Sanejouand, Y.H., Delrot, S. & Coutos-Thévenot, P., 2003. Nonspecific lipid-transfer protein genes expression in grape (*Vitis* sp.) cells in response to fungal elicitor treatments. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(5), p.456–464.

- Gramaje, D., Garcia-Jimenez, J. & Armengol, J., 2010. Field evaluation of grapevine rootstocks inoculated with fungi associated with Petri disease and esca. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61(4), p.512.
- Grayer, R.J. & Harborne, J.B., 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry*, 37(1), p.19–42.
- Guidoni, S., Mannini, F., Ferrandino, A., Argamante, N. & Di Stefano, R., 1997. The effect of grapevine leafroll and rugose wood sanitation on agronomic performance and berry and leaf phenolic content of a Nebbiolo clone (*Vitis vinifera* L.). *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(4), p.438.
- Hall, D. & De Luca, V., 2007. Mesocarp localization of a bi-functional resveratrol/hydroxycinnamic acid glucosyltransferase of Concord grape (*Vitis labrusca*). *The Plant Journal*, 49(4), p.579–591.
- Hamiduzzaman, M.M., Jakab, G., Barnavon, L., Neuhaus, J. M. & Mauch-Mani, B., 2005. Bêta-Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(8), p.819–829.
- Harm, A., Kassemeyer, H. H., Seibicke, T. & Regner, F., 2011. Evaluation of Chemical and Natural Resistance Inducers against Downy Mildew (*Plasmopara viticola*) in Grapevine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62(2), p.184-192.
- Hart, J.H., 1981. Role of phytostilbenes in decay and disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 19(1), p.437–458.
- Hart, J.H. & Shrimpton, D., 1979. Role of stilbenes in resistance of wood to decay. *Phytopathology*, 69(10), p.1138–1143.
- Hattenschwiler, S. & Vitousek, P.M., 2000. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends in Ecology and Evolution*, 15(6), p.238–242.
- Hayasaka, Y., Adams, K.S., Pocock, K.F., Baldock, G.A., Waters, E.J. & Hoj, P., 2001. Use of electrospray mass spectrometry for mass determination of grape (*Vitis vinifera*) juice pathogenesis-related proteins: A potential tool for varietal differentiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), p.1830–1839.
- Heintz, C. & Blaich, R., 1990. Ultrastructural and histochemical studies on interactions between *Vitis vinifera* L. and *Uncinula necator* (Schw.) Burr. *New Phytologist*, p.107–117.
- Herche, R & Gubler, W.D., 2010. Control strategies for trunk diseases of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 49, p.103-133.
- Hillis, W., 1968. Chemical aspects of heartwood formation. *Wood Science and Technology*, 2(4), p.241–259.
- Hillis, W. & Hasegawa, M., 1963. The formation of polyphenols in trees I. Administration of c glucose and subsequent distribution of radioactivity. *Phytochemistry*, 2(2), p.195–199.
- Hmamouchi, M., Es-Safi, N., Lahrichi, M., Fruchier, A. & Essassi, E., 1996. Flavones and flavonols in leaves of some Moroccan *Vitis vinifera* cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(2), p.186.

- Hoos, G. & Blaich, R., 1990. Influence of resveratrol on germination of conidia and mycelial growth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola*. *Journal of Phytopathology*, 129(2), p.102–110.
- Iriti, M. & Faoro, F., 2009. Bioactivity of grape chemicals for human health. *Natural Product Communications*, 4(5), p.611–634.
- Iriti, M., Rossoni, M., Borgo, M., Faoro, F., 2004. Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), p.4406–4413.
- Ito, J. & Niwa, M., 1996. Absolute structures of new hydroxystilbenoids, vitisine C and viniferal from *Vitis vinifera* “Kyohou”. *Tetrahedron*, 52(30), p.9991–9998.
- Ito, T., Akao, Y., Yi, H., Ohguchi, K., Matsumoto, K., Tanaka, T., Linuma, M. & Nozagawa Y., 2003. Antitumor effect of resveratrol oligomers against human cancer cell lines and the molecular mechanism of apoptosis induced by vaticanol C. *Carcinogenesis*, 24(9), p.1489–1497.
- Jackson, P.A.P., Galinha, C.I.R., Perraira, C.S., Fortunato, A., Soares, N.C., Amancio, S.B.Q., Pinto Ricardo, C.P., 2001. Rapid deposition of extensin during the elicitation of grapevine callus cultures is specifically catalyzed by a 40-kDa peroxidase. *Plant Physiology*, 127(3), p.1065.
- Jacobs, A., Dry, I. & Robinson, S., 1999. Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathology*, 48(3), p.325–336.
- Jacquemain, R., 2010. Étude la variabilité intravariétale de la sensibilité aux maladies du bois chez le Cabernet-Sauvignon. *Mémoire de fin de cycle ingénieur de l'ENITAB*, 45p.
- Jaillon, O. Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A, Legeai F, Huguency P, Dasilva C, Horner D, Mica E, Jublot D, Poulain J, Bruyere C, Billault A, Segurens B, Gouyvenoux M, Ugarte E, Cattonaro F, Anthouard V, Vico V, Del Fabbro C, Alaux M, Di Gaspero G, Dumas V, Felice N, Paillard S, Juman I, Moroldo M, Scalabrin S, Canaguier A, Le Clainche I, Malacrida G, Durand E, Pesole G, Laucou V, Chatelet P, Merdinoglu D, Delledonne M, Pezzotti M, Lecharny A, Scarpelli C, Artiguenave F, Pe ME, Valle G, Morgante M, Caboche M, Adam-Blondon AF, Weissenbach J, Quetier F, Wincker P, French-Italian P, 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449, p.463–467.
- Jean-Denis, J.B., 2005. Caractérisation de polyphénols stilbéniques et de dérivés induits ou constitutifs de la vigne impliqués dans sa défense contre l'agent pathogène du mildiou de la vigne, *Plasmopara viticola* (Berk. and Curt.). Thèse de l'Université de Neuchâtel, 284 p.
- Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M. & Meunier, P., 1995. Production of the phytoalexin resveratrol by grapes as a response to *Botrytis* attack under natural conditions. *Journal of Phytopathology*, 143(3), p.135–139.
- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M. & Adrian, M., 2002. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), p.2731–2741.

- John, S., Wicks, T.J., Hunt, J.S., Lorimer, M.F., Oakey, H. & Scott, E.S., 2005. Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata* using *Trichoderma harzianum* and *Fusarium lateritium*. *Australasian Plant Pathology*, 34(4), p.569–575.
- Jousse, C., 2006. Influence of temperature and nutritional requirements for mycelial growth of *Eutypa lata*, a vineyard pathogenic fungus. Thèse de l'Université de Poitiers. 174 p.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., Shibuya, N., 2006. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(29), p.11086.
- Kamoun, S., Young, M., Glascock, C. B. & Tyler, B., 1993. Extracellular protein elicitors from *Phytophthora*: host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 6, p.15–15.
- Karacabey, E. & Mazza, G., 2008. Optimization of solid- liquid extraction of resveratrol and other phenolic compounds from milled grape canes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), p.6318–6325.
- Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P. & Fritig, B., 1987. Biological function of pathogenesis-related proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3- $\beta$ -glucanase activity. *The EMBO Journal*, 6(11), p.3209.
- Keller, M., Viret, O. & Cole, F.M., 2003. *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: defense reaction, latency, and disease expression. *Phytopathology*, 93(3), p.316–322.
- Khan, A., Whiting, C., Rooney, S. & Gubler, D., 2000. Pathogenicity of three species of *Phaeoacremonium* spp. on grapevine in California. *Phytopathologia Mediterranea*, 39(1), p.92-99.
- Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J., Yvin, J., Kopp, M., Kloareg, B. & Fritig, B., 2000. Linear  $\beta$ -1,3-glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology*, 124(3), p.1027.
- Kliwer, W.M., 1966. Sugars and organic acids of *Vitis vinifera*. *Plant Physiology*, 41, p.923-931.
- Koepfen, B. & Basson, D., 1966. The anthocyanin pigments of Barlinka grapes. *Phytochemistry*, 5(1), p.183–187.
- Kortekamp, A., 2006. Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(1), p.58–67.
- Kortekamp, A. & Zyprian, E., 1999. Leaf hairs as a basic protective barrier against downy mildew of grape. *Journal of Phytopathology*, 147(7-8), p.453–459.
- Kortekamp, A., Welter, L., Vogt, S., Knoll, A., Schwander, F., Tögler, R. & Zyprian, E., 2008. Identification, Isolation and characterization of a CC-NBS-LRR candidate disease resistance gene family in grapevine. *Molecular Breeding*, 22(3), P.421-432.
- Kortekamp, A., Wind, R. & Zyprian, E., 1997. The role of callose deposits during infection of two downy mildew-tolerant and two-susceptible *Vitis* cultivars. *Vitis*, 36(2), p.103–104.

- Kuntzmann, P., Villaume, S. & Bertsch, C., 2009. Conidia dispersal of *Diplodia* species in a French vineyard. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(1), p.150–154.
- Kuntzmann, P., Villaume, S., Larignon, P. & Bertsch, C. 2010. Esca, BDA and Eutypiosis: foliar symptoms, trunk lesions and fungi observed in diseased vinestocks in two vineyards in Alsace. *Vitis*, 49(2), p.71–76.
- Lacampagne, S., 2010. Localisation et caractérisation des tannins dans la pellicule du raisin: impact de l'organisation physico-chimique des parois cellulaires sur la composante tannique, la qualité du fruit et la typicité des raisins de Bordeaux. Thèse de l'Université de Bordeaux 2. 210p.
- Landi, L., Murolo, S. & Romanazzi G., 2012. Colonization of *Vitis* spp. wood by sGFP-transformed *Phaemoniella chlamydospora*, a tracheomycotic fungus involved in esca disease. *Phytopathology*, 102(3), p.290-297.
- Landrault, N., Larronde, F., Delaunay, J.C., Castagnino, C., Vercauteren, J., Mérillon, J.M., Gasc, F., Cros, G. & Teissèdre, P.L., 2002. Levels of stilbene oligomers and astilbin in French varietal wines and in grapes during noble rot development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), p.2046-2052.
- Langcake, P., 1981. Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, epsilon-viniferin, alpha-viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology*, 18(2), p.213–226.
- Langcake, P. & McCarthy, W., 1979. The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis*, 18(3), p.244–253.
- Langcake, P. & Pryce, R., 1977a. A new class of phytoalexins from grapevines. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 33(2), p.151–152.
- Langcake, P. & Pryce, R., 1976. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*, 9(1), p.77–86.
- Langcake, P. & Pryce, R.J., 1977b. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry*, 16(8), p.1193–1196.
- Laquitaine, L., Gomès, E., François, J., Marchive, C., Pascal, S., Hamdi, S., Atanassova, R., Delrot, S. & Coutos-Thévenot, P., 2006. Molecular basis of ergosterol-induced protection of grape against *Botrytis cinerea*: induction of type I LTP promoter activity, WRKY, and stilbene synthase gene expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(10), p.1103–1112.
- Larignon, P., 1991. Contribution à l'identification et au mode d'action des champignons associés au syndrome de l'Esca de la Vigne. Thèse de l'Université de Bordeaux 2. 237 p.
- Larignon, P. & Dubos, B., 1997. Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 103(2), p.147–157.
- Larignon, P. & Dubos, B., 2000. Preliminary studies on the biology of *Phaeoacremonium*. *First international workshop on grapevine trunk diseases-esca and grapevine declines*, *Phytopathologia Mediterranea*, 39, p. 184–189.

- Larignon, P., Fulchic, R., Cere, L. & Dubos, B., 2001. Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, 40, p.336.
- Larignon, P., 2010. Effectiveness of *Trichoderma* pruning wound protectants against *E. lata*. *Phytopathologia Mediterranea*, 49, p.103-133.
- Larignon, P., Fontaine, F., Farine, S., Clément, C. & Bertsch, C., 2009. Esca et Black Dead Arm : deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la Vigne. *Comptes Rendus Biologies*, 332, p.765-783.
- Larronde, F., Gaudillère, J.P., Krisa, S., Decendit, A., Deffieux, G. & Mérillon, J.M., 2003. Airborne methyl jasmonate induces stilbene accumulation in leaves and berries of grapevine plants. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(1), p.63.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V.M.T. & Cardinali, A., 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research (F. Imperato, ed.)*, p.23–67.
- Laugé, R. & De Wit, P.J.G.M., 1998. Fungal avirulence genes : Structure and possible functions. *Fungal Genetics and Biology*, 24(3), p. 285-297.
- Laukart, N., Pascoe, I. G., Edwards, J. & Nguyen, N. K., 2001. Curative treatments trialed on young grapevines infected with *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea*, 40(3), p.459–463.
- Laveau, C., Letouze, A., Louvet, G., Bastien, S. & Guerin-Dubrana, L., 2009. Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(1), p.32–46.
- Lecomte, P., Darrieutort G., Dfives, A., Louvet, G., Liminana, J.M. & Blancard, D. 2006. Observations of Black Dead Arm symptoms in Bordeaux vineyards: evolution of foliar symptoms, localisation of longitudinal necroses, questions, hypotheses. *IOBC WPRS Bulletin*, 29(11), p.93.
- Le Henanff, G., Farine, S., Kieffer-Mazet, F., Miclot, A.S., Heitz, T., Mestre, P., Bertsch, C. & Chong, J., 2011. *Vitis vinifera* VvNPR1.1 is the functional ortholog of AtNPR1 and its overexpression in grapevine triggers constitutive activation of PR genes and enhanced resistance to powdery mildew. *Planta*, 234, p.405-417.
- Legrand, V., Dalmayrac, S., Latche, A., Pech, J.C., Bouzayen, M., Fallot, J., Torregrosa, L., Bouquet, A. & Roustan, J.P., 2003. Constitutive expression of Vr-ERE gene in transformed grapevines confers enhanced resistance to eutypine, a toxin from *Eutypa lata*. *Plant Science*, 164(5), p.809–814.
- Lehoczky, J., 1974. Black dead-arm disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 9(3-4), p.319–327.
- Lesniewska, E., Adrian, M., Klinguer, A. & Pugin, A., 2004. Cell wall modification in grapevine cells in response to UV stress investigated by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 100(3-4), p.171–178.
- Letousey, P., Baillieul, F., Perrot, G., Rabenoelina, F., Boulay, M., Vaillant-Gaveau, N., Clément, C. & Fontaine, F., 2010. Early Events Prior to Visual Symptoms in the Apoplectic Form of Grapevine Esca Disease. *Phytopathology*, 100(5), p.424–431.

- Leubner-Metzger, G. & Meins, F., 1999. Functions and regulation of plant bêta-1,3-glucanases (PR-2). *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, p.49–76.
- Lima, M.R.M., Felgueiras M.L., Graça, G., Rodrigues, J.E.A., Barros, A., Gil, A.M. & Dias, A.C.P., 2010. NMR metabolomics of esca disease-affected *Vitis vinifera* cv. Alvarinho leaves. *Journal of Experimental Botany*, 61(14), p.4033.
- Lima, M.R.M., Ferreres, F. & Dias, A.C.P., 2012. Response of *Vitis vinifera* cell cultures to *Phaeoconiella chlamydospora* : changes in phenolic production, oxidative state and expression of defence-related genes. *European Journal of Plant Pathology*. 132,P.133-146.
- Link, K.P., Angell, H. & Walker, J., 1929. The isolation of protocatechuic acid from pigmented onion scales and its significance in relation to disease resistance in onions. *Journal of Biological Chemistry*, 81(2), p.369.
- Luini, E., Fleurat-Lessard, P., Rousseau, L., Roblin, G. & Berjeaud, J.M., 2010. Inhibitory effects of polypeptides secreted by the grapevine pathogens *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on plant cell activities. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(5-6), p.403–411.
- Luque-Rodríguez, J.M., Pérez-Juan, P. & de Castro, M.D.L., 2006. Extraction of polyphenols from vine shoots of *Vitis vinifera* by superheated ethanol-water mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), p.8775–8781.
- Magnin-Robert, M., Letousey, P., Spagnolo, A., Rabenoelina, F., Jacquens, L., Mercier, L., Clément, C. & Fontaine F., 2011. Leaf stripe form of esca induces alteration of photosynthesis and defence reactions in presymptomatic leaves. *Functional Plant Biology*, 38, p.856-866.
- Mailhac, N., Pouzoulet, J., Lummerzheim, M. & Violleau, F., 2010. Impact of ozonation on grapevine scion decontamination. *Phytopathologia Mediterranea*, 49, p.103-133.
- Maldonado, A.M., Doerner, P., Dixon, R. A., Lamb, C. J. & Cameron, R. K., 2002. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 419(6905), p.399–403.
- Marchi, G., Surico, G., Mugnai, L., D’Ovidio, R. & Roberti, S., 2001. Pectic Enzymes Production by *Phaeoconiella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea*, 40(3), p.407–416.
- Marrou, H., Destrac-Irvine, A., Cerovic, Z. & Goutouly, J.P., 2010. Contribution of high-throughput technologies to the comprehension of environment factors involved in grapevine trunk diseases expression. XIth Congress of the European Society for Agronomy, august 29, September 3<sup>rd</sup>, Montpellier, France.
- Martin, N., Vesentini, D., Rego, C., Monteiro, S., Oliveira, H. & Boavida Ferreira, R., 2009. *Phaeoconiella chlamydospora* infection induces changes in phenolic compounds content in *Vitis vinifera*. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(1), p.101–116.
- Martos, S., Andolfi, A., Luque, J., Mugnai, L., Surico, G. & Evidente, A., 2008. Production of phytotoxic metabolites by five species of Botryosphaeriaceae causing decline on grapevines, with special interest in the species *Neofusicoccum luteum* and *N. parvum*. *European Journal of Plant Pathology*, 121(4), p.451–461.

- Mattivi, F., Reniero, F. & Korhammer, S., 1995. Isolation, characterisation and evolution in red wines vinification of resveratrol monomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(7), p.1820-1823.
- Mattivi, F., Vrhorsek, U., Malacarne, G., Masuero, D., Zulini, L., Stefanini, M., Mose, C., Velasco, R. & Guella, G., 2011. Profiling of resveratrol oligomers, important stress metabolites accumulating in the leaves of hybrid *V. vinifera* (Merzling x Teroldego) genotypes infected with *Plasmopara viticola*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), p.5364-5375.
- Mazet, F., Farine, S., Chong, J., Laloue, H., Larignon, P. & Bertsch, C., 2010. Antifungal activity of saponins against botryosphaeriaceous pathogens of grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 49, p.103-133.
- Mazullo, A., Di Marco, S., Osti, F. & Cesari, A., 2000. Bioassays on the activity of resveratrol, pterostilbene and phosphorous acid towards fungi associated with esca of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 39, p.357-365.
- Melchior, F. & Kindl, H., 1990. Grapevine stilbene synthase cDNA only slightly differing from chalcone synthase cDNA is expressed in *Escherichia coli* into a catalytically active enzyme. *FEBS letters*, 268(1), p.17-20.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, M., Kaku, H., Shibuya, N., 2007. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), p.19613.
- Mohamed, N., Lherminier, J., Farmer, M.J., Fromentin, J., Béno, N., Houot, V., Milat, M.Z. & Blern, J.P., 2007. Defense responses in grapevine leaves against *Botrytis cinerea* induced by application of a *Pythium oligandrum* strain or its elicitor, oligandrin, to roots. *Phytopathology*, 97(5), p.611-620.
- Moller, W. & Kasimatis, A., 1978. Dieback of grapevine caused by *Eutypa armeniacae*. *Plant Disease Reporter*, 62, p.254-258.
- Moller, W., Kasimatis, A. & Kissler, J., 1974. A dying arm disease of grape in California. *Plant Disease Reporter*, 58, p.869-871.
- Molyneux, R.J., Mahoney, N., Bayman, P., Wong, R.Y., Meyer, K. & Irelan, N., 2002. *Eutypa* dieback in grapevines: differential production of acetylenic phenol metabolites by strains of *Eutypa lata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), p.1393-1399.
- Monagas, M., Hernández-Ledesma, B., Gómez-Cordovés, C. & Bartolomé, B., 2006. Commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. leaves and grape skins: antioxidant and chemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2), p.319-327.
- Monteiro, S., Barakat, M., Piçarra-Pereira, M. A., Teixeira, A. R. & Ferreira, R. B., 2003. Osmotin and thaumatin from grape: a putative general defense mechanism against pathogenic fungi. *Phytopathology*, 93(12), p.1505-1512.
- Morrissey, J.P. & Osbourn, A.E., 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(3), p.708.
- Mugnai, L., Graniti, A. & Surico, G., 1999. Esca (black measles) and brown wood-streaking: Two old and elusive diseases of grapevines. *Plant disease*, 83(5), p.404-418.

- Muller, K. & Borger, H., 1940. Experimentelle untersuchungen uber die Phytophthora-resistenz der kartoffel. *Arb. Biol. Reichsanstalt. Landw. Forstw. Berlin*, 23, p.189–231.
- Munkvold, G. & Marois, J., 1995. Factors associated with variation in susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Eutypa lata*. *Phytopathology*, 85(2), p.249–256.
- Nascimento, T., Rego, C. & Oliveira, H., 2007. Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk diseases. *Phytopathologia Mediterranea*, 46(2), p.218–224.
- Nassra, M., Krisa, S., Papastamoulis, Y., Waffo-Téguo, P. & Mérillon, J.M., 2011. Inhibition of LPS-induced NO and TNF- $\alpha$  production in BV2 cells by stilbenoids compounds. International Conference of Polyphenols and Health, October 2011, Spain.
- Nicholson, R.L., Kollipara, S. S., Vincent, J. R., Lyons, P. C. & Cadena-Gomez, G., 1987. Phytoalexin synthesis by the sorghum mesocotyl in response to infection by pathogenic and nonpathogenic fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(16), p.5520.
- Njoroge, S., Vallad, G.E., Park, S.Y., Kang, S., Koike, S.T., Bolda, M., Burman, P., Polonik, W. & Subbarao, K.V., 2011. Phenological and phytochemical changes correlate with differential interactions of *Verticillium dahliae* with broccoli and cauliflower. *Phytopathology*, 101(5), p.523–534.
- Nyerges, P., Szabo, E. & Donko, E., 1975. The role of anthocyan and phenol compounds in the resistance of grapes against *Botrytis* infection. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 10, p.21-32.,
- Octave, S., Amborabé, B. E., Fleurat-Lessard, P., Bergès, T. & Roblin, G., 2006. Modifications of plant cell activities by polypeptides secreted by *Eutypa lata*, a vineyard fungal pathogen. *Physiologia Plantarum*, 128(1), p.103–115.
- Octave, S., Fleurat-Lessard, P. & Roblin, G., 2009. Diagnosis of *Eutypa lata* infection in grapevines by serological detection of secreted polypeptides. *Journal of Plant Pathology*, 91(2), p.321–330.
- Paillassa, E., Dubos, B., Larignon, P. & Chevrier, J., 1992. L'inoculum infectieux d'*Eutypa lata*. Sa formation, son évolution et sa dispersion: les facteurs qui les influencent. *Phytoma*, 440, p.21–23.
- Park, S.W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S. & Klessig, D. F., 2007. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, 318(5847), p.113.
- Pascoe, I. & Cottral, E., 2000. Developments in grapevine trunk diseases research in Australia. *First international workshop on grapevine trunk diseases-esca and grapevine declines*, *Phytopathologia Mediterranea*, 39, p. 68–75.
- Paul, B., Chereyathmanjiyil, A., Masih, I., Chapuis, L. & Benoît, A., 1998. Biological control of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grapevine and elicitation of stilbene phytoalexin (resveratrol) by a soil bacterium. *FEMS Microbiology Letters*, 165(1), p.65–70.
- Pawlus, Waffo-Téguo & Mérillon, 2011. Stilbenoid Chemistry from Wine and the Genus *Vitis*, a Review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, (45) in press.

- Peer, W.A., Brown, W.A., Tague, B.W., Muday, G.K., Taiz, L. & Murphy A.S., 2001. Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126(2), p.536.
- Perazzolli, M., Dagostin, S., Ferrari, A., Elad, Y. & Pertot, I., 2008. Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. *Biological control*, 47(2), p.228–234.
- Péros, J.P. & Berger, G., 1999. Diversity within natural progenies of the grapevine dieback fungus *Eutypa lata*. *Current Genetics*, 36(5), p.301–309.
- Pezet, R. & Pont, V., 1988. Mise en évidence de pterostilbene dans les grappes de *Vitis vinifera*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 26(5), p.603–607.
- Pezet, R. & Pont, V., 1995. Mode of action of Vitaceae stilbenes on fungal cells. Ed Daniel M and Purkayastha R.E. *Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action*, p.317–331. Marcel Dekker Inc, New York, USA.
- Pezet, R., Gindro, K., Viret, O. & Spring, J. L., 2004. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65(6), p.297–303.
- Pezet, R., Viret, O., Perret, C. & Tabacchi, R., 2003. Latency of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. and biochemical studies during growth and ripening of two grape berry cultivars, respectively susceptible and resistant to grey mould. *Journal of Phytopathology*, 151(4), p.208–214.
- Phillips, A.J.L., 1998. *Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excoriose and dieback of grapevines in Portugal. *Journal of Phytopathology*, 146(7), p.327–332.
- Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J. & van Loon, L.C., 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online*, 10(9), p.1571.
- Pitt, W., Huang, R., Steel, C.C. & Savocchia, S., 2010. Identification, distribution and current taxonomy of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine decline in New South Wales and South Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(1), p.258–271.
- Poinssot, B., Vandelle, E., Bentéjac, M., Adrian, M., Levis, C., Brygoo, Y., Gaun, J., Sicilia, F., Coutos-Thévenot, P. & Pugin, A., 2003. The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(6), p.553–564.
- Pont, V. & Pezet, R., 1990. Relation between the chemical structure and the biological activity of hydroxystilbenes against *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology*, 130(1), p.1–8.
- Punja, Z.K. & Zhang, Y.Y., 1993. Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. *Journal of Nematology*, 25(4), p.526.
- Püssa, T., Floren, J., Kuldkepp, P. & Raal, A., 2006. Survey of grapevine *Vitis vinifera* stem polyphenols by liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), p.7488–7494.

- Renaud, J.M., Tsoupras, G. & Tabacchi, R., 1989. Biologically active natural acetylenic compounds from *Eutypa lata* (Pers: F.) TUL. *Helvetica Chimica Acta*, 72(5), p.929–932.
- Renault, A., Deloire, A., Letinois, I., Kraeva, E., Tesniere, C., Ageorges, A., Redon, C. & Bierne, J., 2000. Bêta-1, 3-glucanase gene expression in grapevine leaves as a response to infection with *Botrytis cinerea*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(1), p.81.
- Repka, V., 2001. Elicitor-stimulated induction of defense mechanisms and defense gene activation in grapevine cell suspension cultures. *Biologia plantarum*, 44(4), p.555–565.
- Repka, V., Fischerová, I. & Šilhárová, K., 2004. Methyl jasmonate is a potent elicitor of multiple defense responses in grapevine leaves and cell-suspension cultures. *Biologia plantarum*, 48(2), p.273–283.
- Ribéreau-Gayon, P., 1965. Identification d'esters des acides cinnamiques et de l'acide tartrique dans les limbes et les baies de *V. vinifera*. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences*, 260, p.341–3.
- Ridgway, H., Sleight, B. & Stewart, A., 2002. Molecular evidence for the presence of *Phaeoemoniella chlamydospora* in New Zealand nurseries, and its detection in rootstock mothervines using species-specific PCR. *Australasian Plant Pathology*, 31(3), p.267–271.
- Rioux, D. & Ouellette, G., 1991. Barrier zone formation in host and nonhost trees inoculated with *Ophiostoma ulmi*. I. Anatomy and histochemistry. *Canadian Journal of Botany*, 69(9), p.2055–2073.
- Robert, N., Roche, K., Lebeau, Y., Breda, C., Boulay, M., Esnault, R. & Buffard, D., 2002. Expression of grapevine chitinase genes in berries and leaves infected by fungal or bacterial pathogens. *Plant Science*, 162(3), p.389–400.
- Robinson, S.P., Jacobs, A.K. & Dry, I.B., 1997. A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. *Plant Physiology*, 114(3), p.771.
- Rodriguez-Bonilla, P., Mendez-Cazorla, L., Lopez-Nicolas, J. M. & Garcia-Carmona, F., 2010. Kinetic mechanism and product characterization of the enzymatic peroxidation of pterostilbene as model of the detoxification process of stilbene-type phytoalexins. *Phytochemistry*, 72(1), p.100-108.
- Romanazzi, G., Murolo, S., Pizzichini, L. & Nardi, S., 2009. Esca in young and mature vineyards, and molecular diagnosis of the associated fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 125(2), p.277–290.
- Ron, M. & Avni, A., 2004. The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *The Plant Cell Online*, 16(6), p.1604.
- Rooney, S. & Gubler, W.D., 2001. Effect of hot water treatments on eradication of *Phaeoemoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium inflatipes* from dormant grapevine wood. *Phytopathologia Mediterranea*, 40(3), p.467–472.
- Rotter, A., Camps, C., Lohse, M., Kappel, C., Pilati, S., Hren, M., Stitt, M., Coutos-Thévenot, P., Moser, C., Usadel, B., Delrot, S. & Gruden, K., 2009. Gene expression profiling in susceptible interaction of grapevine with its fungal pathogen *Eutypa lata*: extending MapMan ontology for grapevine. *BMC Plant Biology*, 9(1), p.104.

- Roubelakis-Angelakis, K.A., 2009. *Grapevine molecular physiology & biotechnology*, Springer Verlag.
- Roubelakis-Angelakis, K.A., 2001. *Molecular biology & biotechnology of the grapevine*, Kluwer Academic Pub.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., Hunt, M., 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 8(10), p.1809.
- Salzman, R.A., Tikhonova, I., Bordelon, B. P., Hasegawa, P. M. & Bressan, R. A. 1998. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiology*, 117(2), p.465.
- Santos, C., Fragoeiro, S. & Phillips, A., 2005. Physiological response of grapevine cultivars and a rootstock to infection with *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* isolates: an *in vitro* approach using plants and calluses. *Scientia Horticulturae*, 103(2), p.187–198.
- Santos, C., Fragoieri, S., Valentim, H. & Phillips, A., 2006. Phenotypic characterisation of *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* strains isolated from grapevines: enzyme production and virulence of extra-cellular filtrate on grapevine calluses. *Scientia Horticulturae*, 107(2), p.123–130.
- Sbaghi, M., Jeandet, P., Bessis, R. & Leroux, P., 1996. Degradation of stilbene-type phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines. *Plant Pathology*, 45(1), p.139–144.
- Schaefer, H., Rentzsch, M. & Breuer, M., 2008. Anthocyanins reduce fungal growth in fruits. *Natural Product Communications*, 3, p.1267–1272.
- Schmidlin, L., Poutaraud, A., Claudel, P., Mestre, P., Prado, E., Santos-Rosa, M., Wiedemann-Merdinoglu, S., Karst, F., Merdinoglu, D. & Hugueney, P., 2008. A stress-inducible resveratrol O-methyltransferase involved in the biosynthesis of pterostilbene in grapevine. *Plant Physiology*, 148(3), p.1630.
- Schmidt, C., Wolf, G. & Lorenz, D., 1999. Production of extracellular hydrolytic enzymes by the grapevine dieback fungus *Eutypa lata*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 106(1), p.1–11.
- Schnee, S., Viret, O. & Gindro, K., 2008. Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(4-6), p.128–133.
- Schultz, T.P., Hubbard, T.F., LeHong, J., Fischer, T. & Nicholas, D.D., 1990. Role of stilbenes in the natural durability of wood : fungicidal structure-activity relationships. *Phytochemistry*, 29, p.1501-1507.
- Schultz, T.P., Boldin, W.D., Fischer, T.H., Nicholas, D.D., Macmurtrey, K.D. & Pobanz, K., 1992. Structure-fungicidal properties of some 3-and 4-hydroxylated stilbenes and bibenzyl analogues. *Phytochemistry*, 31(11), p.3801–3806.
- Seppänen, S.K., Syrjala, L., von Weissenberg, K., Teeri, T.H., Paajanen, L. & Pappinen, A., 2004. Antifungal activity of stilbenes in *in vitro* bioassays and in transgenic *Populus* expressing a gene encoding pinosylvin synthase. *Plant Cell Reports*, 22(8), p.584–593.

- Shain, L., 1979. Dynamic responses of differentiated sapwood to injury and infection. *Phytopathology*, 69, p.1143.
- Shigo, A.L. & Marx, H.G., 1977. Compartmentalization of decay in trees. *Agricultural Information Bulletin*, 405. 73 p.
- Slaughter, A.R., Hamiduzzaman, M. M., Gindro, K., Neuhaus, J. M. & Mauch-Mani, B., 2008. Bêta-aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew: involvement of pterostilbene. *European Journal of Plant Pathology*, 122(1), p.185–195.
- Sosnowski, M.R., Creaser, M.L. & Wicks, T., 2004. Evaluating fungicides as pruning wound treatments to control eutypa dieback. *The Australian and New Zealand Grapegrower & Winemaker*, p.51-53.
- Sosnowski, M.R., Shtienberg, D., Creaser, M.L., Wicks, T.J., Lardner, R. & Scott, E.S., 2007. The influence of climate on foliar symptoms of Eutypa dieback in grapevines. *Phytopathology*, 97(10), p.1284–1289.
- Souquet, J.M., Labarbe, B., Le Guernevé, C., Cheynier, V. & Moutounet, M., 2000. Phenolic composition composition of grape stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, p.1076-1080.
- Spagnolo, A., Marchi, G., Peduto, F., Phillips, A.J.L. & Surico, G., 2011. Detection of Botryosphaeriaceae within grapevine woody tissue by nested PCR, with particular emphasis on the *Neofusicoccum parvum/N. ribis* complex. *European Journal of Plant Pathology*, 129, p.485-500.
- Sparapano, L., Bruno, G. & Graniti, A., 2006. Effects on plants of metabolites produced in culture by *Phaeoacremonium chlamydosporum*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. *Phytopathologia Mediterranea*, 39(1), p.169–177.
- Sparvoli, F., Martin, C., Scienza, A., Gavazzi, G. & Tonelli, C., 1994. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Molecular Biology*, 24(5), p.743–755.
- Sun, A.Y., Simonyi, A. & Sun, G.Y., 2002. The « French Paradox » and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(4), p.314–318.
- Surico, G., Marchi, G., Braccini, P. & Mugnai, L., 2000. Epidemiology of esca in some vineyards in Tuscany (Italy). *Phytopathologia Mediterranea*, 39(1), p.190–205.
- Tabacchi, R., Fkyerat, A., Poliart, C. & Dubin, G.M., 2000. Phytotoxins from fungi of esca of grapevine. *First international workshop on grapevine trunk diseases-esca and grapevine declines*, *Phytopathologia Mediterranea*, (39),. p. 156–161.
- Tawata, S., Taira, S., Kobamoto, N., Zhu, J., Ishihara, M. & Toyama, S., 1996. Synthesis and antifungal activity of cinnamic acid esters. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(5), p.909.
- Travadon, R., Baumgartner, P.E., Rolshausen, W.D., Sosnowski, M.R., Lecomte, P., Halleen, F. & Péros, J.P., 2011. Genetic structure of the fungal grapevine pathogen *Eutypa lata* from four continents. *Plant Pathology*, 61(1), p.85-95.

- Trocchi, L., Calamassi, R., Mori, B., Mugnai, L. & Surico, G., 2001. *Phaeoemoniella chlamydospora*-grapevine interaction: histochemical reactions to fungal infection. *Phytopathologia Mediterranea*, 40(3), p.400–406.
- Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Vernet, G. & Aziz, A., 2006. Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 114(4), p.405–413.
- Trouvelot, S., Varnier, A.L., Allegre, M., Mercier, L., Baillieul, F., Arnould, C., Gianinazzi-Pearson, V., Klarzynski, O., Joubert, J.M. & Pugin, A., 2008. A bêta-1,3-glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(2), p.232–243.
- Umemoto, N., Karitani, M., Iwamatsu, A., Yoshikawa, M. & Yamoaka, N., 1997. The structure and function of a soybean, Bêta-glucan-elicitor-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, p.1029–1034.
- Urbez-Torres, J.R., Adams, P., Kamas, J. & Gubler, W. D., 2009. Identification, incidence, and pathogenicity of fungal species associated with grapevine dieback in Texas. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60(4), p.497.
- Úrbez-Torres, J.R., Leavitt, G. M., Voegel, T. M. & Gubler, W. D., 2006. Identification and Distribution of *Botryosphaeria* spp. Associated with Grapevine Cankers in California. *Plant Disease*, 90, p.1490-1503.
- Vandelle, E., Poinssot, B., Wendehenne, D., Bentéjac, M. & Pugin, A. 2006. Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(4), p.429–440.
- Van Loon, L. & Van Kammen, A., 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum*: II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, 40(2), p.199–211.
- Van Loon, L., Bakker, P. & Pieterse, C., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36(1), p.453–483.
- Van Loon, L., Rep, M. & Pieterse, C., 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44, p.135–162.
- Van Niekerk, J. et al., 2006. *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 45(4), p.43–54.
- Van Niekerk, J.M., Fourie, P.H., Halleen, F. & Crous, P.W., 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia*, 96(4), p.781.
- Varnier, A.L., Sanchez, L., Vatsa, P., Boudesocque, L., Garcia-Brugger, A., Rabenoelina, F., Sorokin, A., Renault, J.H., Kauffmann, S., Pugin, A., Clément, C., Baillieul, F. & Dorey, S., 2009. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. *Plant, Cell & Environment*, 32(2), p.178–193.
- Velasco R, Zharkikh A, Troglio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, Pindo M, Fitzgerald LM, Vezzulli S, Reid J, Malacarne G, Iliev D, Coppola G, Wardell B, Micheletti D, Macalma T,

- Facci M, Mitchell JT, Perazzolli M, Eldredge G, Gatto P, Oyzerski R, Moretto M, Gutin N, Stefanini M, Chen Y, Segala C, Davenport C, Dematte L, Mraz A, Battilana J, Stormo K, Costa F, Tao Q, Si-Ammour A, Harkins T, Lackey A, Perbost C, Taillon B, Stella A, Solovyev V, Fawcett JA, Sterck L, Vandepoele K, Grando SM, Toppo S, Moser C, Lanchbury J, Bogden R, Skolnick M, Sgaramella V, Bhatnagar SK, Fontana P, Gutin A, Van de Peer Y, Salamini F, Viola R (2007) A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE* 2: e1326
- Venäläinen, M., Harju, A.M., Saranpää, P., Kainulainen, P., Tiitta, M. & Velling, P., 2004. The concentration of phenolics in brown-rot decay resistant and susceptible Scots pine heartwood. *Wood Science and Technology*, 38(2), p.109–118.
- Verhagen, B.W.M., Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Höfte M. & Aziz, A., 2010. *Pseudomonas* spp.-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 61(1), p.249.
- De Vleeschauwer, D. & Höfte, M., 2009. Rhizobacteria-induced systemic resistance. *Advances in Botanical Research*, 51, p.223–281.
- Wagschal, I., Abou-Mansour, E., Petit A.N., Clément, C. & Fontaine, F., 2008. Wood diseases of grapevine: a review on eutypa dieback and esca. *Plant-Microbe Interactions*, p.367–391.
- Waite, H, May, P & Bossinger, G., 2010. The effects of hot water treatment and anaerobic cold storage on growth of grapevine cuttings. *Phytopathologia Mediterranea*, 49, p.103-133.
- Wang, W., Bianchi, L., Scali, M., Liu, L., Bini, L. & Cresti, M., 2009. Proteomic analysis of beta-1, 3-glucanase in grape berry tissues. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(3), p.597–604.
- Wang, W., Tang, K., Yang, H.R., Wen, P.F., Zhang, P., Wang, H.L. & Huang, W.D., 2010. Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(2-3), p.142–152.
- Waters, E.J., Shirley, N.J. & Williams, P.J., 1996. Nuisance proteins of wine are grape pathogenesis-related proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), p.3–5.
- Weidner, S., Karolak, M., Karamac, M., Kosinska, A. & Amarowicz, R., 2009. Phenolic compounds and properties of antioxidants in grapevine roots (*Vitis vinifera* L.) under drought stress followed by recovery. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 78, p.97–103.
- Wicks, T. & Creaser, M., 2001. Yearly variation in Eutypa dieback symptoms and the relationship to grapevine yield. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, (452), p.50–52.
- Wicks, T. & Davis, K., 1999. The effect of *Eutypa* on grapevine yield. *Australian Grapegrower and Winemaker*, (15-16).
- Witzell, J.W.J. & Martín, J.A., 2008. Phenolic metabolites in the resistance of northern forest trees to pathogens-past experiences and future prospects. *Canadian Journal of Forest Research*, 38(11), p.2711–2727.
- Woodward, S. & Pearce, R., 1988. The role of stilbenes in resistance of Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong. Carr.) to entry of fungal pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 33(1), p.127–149.

- Yamada, T., 2001. Defense mechanisms in the sapwood of living trees against microbial infection. *Journal of Forest Research*, 6(3), p.127–137.
- Yan, K.X., Terashima, K., Takaya, Y. & Niwa, M., 2001. A novel oligostilbene named (+)-viniferol A from the stem of *Vitis vinifera* “Kyohou”. *Tetrahedron*, 57(14), p.2711–2715.
- Yim, N.H., Ha, D.T., Trung, T.H., Kim, J.P., Lee, S.M., Na, M.K., Jung, H.J., Kim, H.S., Kim, Y.H. & Bae, K.H., 2010. The antimicrobial activity of compounds from the leaf and stem of *Vitis amurensis* against two oral pathogens. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(3), p.1165–1168.
- Zga, N., Papastamoulis, Y., Toribio, A., Richard, T., Delaunay, J.C., Jeandet, P., Renault, J.H., Monti, J.P., Mérillon, J.M. & Waffo-Téguo, P., 2009. Preparative purification of antiamyloidogenic stilbenoids from *Vitis vinifera* (Chardonnay) stems by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography B*, 877(10), p.1000–1004.

# Publications et communications scientifiques

---

## Article dans un journal international à comité de lecture

**C. Lambert**, Bisson J., Papastamoulis Y., Waffo-Téguo P., Corio-Costet M.F., Mérillon J.M. and Cluzet S. *Trunk disease pathogens and grapevine phenolics : growth response of fungi and activity of compounds*. (soumis)

## Communication orale en congrés international

**C. Lambert**, Y. Papastamoulis, Waffo-Téguo P., Mérillon J.M. and Cluzet S. *Effects of phenolic compounds towards grapevine wood decay fungi*. 9<sup>th</sup> International Symposium of Oenology, 15-16 juin 2011, Bordeaux.

## Communication affichée en congrés international

**Lambert C.**, Cluzet S., Richard T. and Mérillon J.M. Involvement of phenolics in plant defense against grapevine wood decay. 25<sup>th</sup> *International Conference on Polyphenols*, 24-27 août 2010, Montpellier.

## Autres communications en congrés internationaux

Dufour M.C., Bouscaut J., **Lambert C.**, Cluzet S. and Corio-Costet M.F. *Modulation of expression patterns of defense genes and stilbene production in grapevine in response to biotrophic pathogen diversity (Erysiphe necator and Plasmopara viticola), after elicitation by*

*BTH*. PR-proteins and induced resistance against pathogens and insects, 4-8 septembre 2011, Neuchâtel, Suisse.

Dufour M.C., **Lambert C.**, Cluzet S. and Corio-Costet M.F. *Induced defense against pathogens (practical aspects)*. PR-proteins and induced resistance against pathogens and insects, 4-8 septembre 2011, Neuchâtel, Suisse.

Lacampagne S., **Lambert C.**, Deytieux-Belleaux C., L'Hyvernay A., Donèche B. and Gény L. *Expression, activity and cellular localization of Pectin MethylEsterase in grape berry skin during ripening*. 6<sup>th</sup> International Postharvest Symposium, avril 2009, Antalya, Turquie.

### **Autres communications en congrés nationaux**

**C. Lambert**, Y. Papastamoulis, Waffo-Tégou P., Mérillon J.M. and Cluzet S. *Effet antimicrobien de composés naturels de la vigne vis-à-vis d'agents pathogènes fongiques : observation in situ du mycélium par microscopie électronique à balayage*. Journées SEMPA (Scanning Electron Microscope Philips Association) 31 mars 2011, Bordeaux.

Faurie B., Belhadj A.,Telef-Micouleau N., Cluzet S., **Lambert C.**, Corio-Costet M.F. and Mérillon J.M. *Methyl jasmonate or ethephon treatment versus a co-treatment with both molecules on grapevines: defense responses and protection against Erysiphe necator*. COST 858 Final meeting, 27-30 octobre 2009, Bordeaux.

Faurie B., Belhadj A.,Telef-Micouleau N., **Lambert C.**, Cluzet S., and Mérillon J.M. *Protection de la vigne contre l'oïdium : élicitation des défenses naturelles de la plante par le méthyle jasmonate et l'éthéphon*. 2<sup>ème</sup> Journée PO<sup>2</sup>N, juin 2009, Perpignan.

**Lambert C.**, Cluzet S., Lucas S., Richard T., Bisson J., Waffo-Tégou P. and Mérillon J.M. *Are phenolics involved in grapevine defence against wood decay ?* Journée scientifique de l'Ecole Doctorale, Sciences de la Vie et de la Santé, Bordeaux 1, Bordeaux Segalen, avril 2010, Arcachon.