

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR

Ecole Doctorale des Sciences Exactes et Leurs Applications ED211

Spécialité

Physiologie-Biologie

Relations entre l'oomycète, *Pythium oligandrum*, et la vigne :
étude de l'induction de résistance contre un agent pathogène
du bois et impact sur les communautés microbiennes
colonisant la plante

Présentée et soutenue le 14 décembre 2015

par

Amira YACOUB

MEMBRES DU JURY

Marc BARDIN, Chargé de Recherche-HDR INRA Avignon

Emile BENIZRI, Professeur Université de Lorraine

Christophe BERTSCH, Professeur Université de Haute Alsace

Stéphane COMPANT, Maître de Conférences AIT, Autriche

Florence FONTAINE, Maître de Conférences-HDR Univ.de Reims et Champagne-Ardenne

Rémy GUYONEAUD, Professeur Université de Pau et des Pays de l'Adour

Patrice REY, Professeur Bordeaux Sciences Agro

Rapporteur

Examinateur

Rapporteur

Examinateur

Examinatrice

Co-directeur

Co-directeur

Remerciements

En premier lieu, je tiens à exprimer mes profonds remerciements à mes directeurs de thèse Mr Patrice Rey et Mr Rémy Guyoneaud qui m'ont soutenue tout au long de ces trois années de thèse. Patrice, je suis très reconnaissante pour l'aide continuelle que tu m'as apportée et pour ton encouragement à mener à terme ma thèse. Merci pour ta confiance que tu m'as accordée depuis le stage de Mastère. Merci Rémy pour tes conseils qui m'ont aidé à améliorer ce travail.

Je tiens à remercier les rapporteurs et les examinateurs de mon travail de thèse qui ont accepté de juger ce travail qui, par leurs critiques et appréciations, ne pourront qu'enrichir mon travail.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du l'UMR, Santé et Agroécologie du Vignoble à INRA Bordeaux. Je tiens à remercier Denis Thiery, le directeur de l'UMR, pour son accueil au sein du laboratoire.

Je remercie également les financeurs de ce projet : le ministère Français de l'agriculture (projet CASDAR V1302), la fondation Poupelain et le ministère Tunisien.

Je tiens à remercier Mr Stéphane Compant et tout le personnel de l'équipe du laboratoire AIT de Tulln pour leur accueil chaleureux lors de mon stage en Autriche. Stéphane, merci beaucoup pour tes conseils précieux et toutes les « Yacoubii » que tu m'as montrés 😊.

Je voulais remercier spécialement mon maitre de stage de projet de fin d'étude Mr Samir Chebil. Grâce à lui, j'ai commencé ma belle aventure avec les maladies du bois de la vigne.

Je dis un grand merci à mes collègues du bureau pour votre soutien et vos encouragements c'était une chance d'être la seule doctorante parmi vous. Jonathan, merci beaucoup pour ta patience et tes conseils depuis mon Mastère. C'était un plaisir de travailler avec toi durant toute cette période. Emilie, merci beaucoup pour ton soutien moral et pour ton aide surtout pendant la dernière période toujours difficile de la thèse. Merci Chloé pour tes conseils et tes encouragements « Tu tiens bien Amira ».

Je tiens à remercier toutes les personnes de l'UMR SAVE qui ont contribué à la réalisation de ce travail. La très bonne humeur et l'ambiance au sein du groupe m'ont permis de mener mes travaux de recherche de façon très agréable. Noël, merci pour le beau travail que tu as fait, nos discussions sur les analyses microarrays et RNAseq étaient vraiment très intéressantes et indispensables pour la compréhension de ces analyses. Jess, merci pour tes conseils tout au long de cette période et surtout pour l'encadrement des stagiaires quand on part tous en vacances ☺. David, merci pour ton coup de main pour les manips et pour des corrections du manuscrit. Je tiens à remercier Marie Cécile et Marie France pour leurs corrections et leur gentillesse de me répondre sur toutes mes questions concernant l'expression des gènes et la RT-qPCR. Merci Frédéric pour ton aide pour les analyses statistiques. Merci Gillou et Séb pour votre coup de main lors des expérimentations en serre. Je tiens à remercier Ray pour les cours d'anglais, c'étaient vraiment de très beaux moments. Merci aussi pour tes corrections. Merci à tous mes amis thésards qui ont partagé avec moi cette belle aventure : Awatef, Mayssa, Nada et Shuxian.

Rana « emm Jadou », je ne trouve pas les mots pour te remercier pour ton soutien durant ces trois années de thèse et surtout à la fin. Tu étais plus qu'une sœur, tu m'as toujours aidée à surmonter les moments difficiles. Merci pour tous les beaux moments passés ensemble. « Aychek baaarcha w allah ykhalilek Jadou yé rabbi » (Voilà un joli mix Tunisio-Syrien ☺). Un grand merci à Aref aussi.

Je termine cette page par un remerciement à toute ma famille, tout particulièrement à mes parents (Sadok et Nabiha) et mes sœurs (Ines et Aroua), à qui je dédie cette thèse. Merci pour votre soutien, vous avez su me soutenir malgré la distance. Merci aussi à mes beaux frères (Amine et Sami). Un grand merci à mes amis au dehors du labo : Sonia, Mouna et Nabil. Merci pour tous les beaux moments passés ensemble. Vous étiez ma deuxième famille et grâce à vous j'ai pu tenir jusqu'au bout.

Enfin un gros bisou à ma petite nièce Mariouuuma, c'est bon « ATAHAW » c'est fini la thèse « HAMDOLLAH » ☺

Relations entre l'oomycète, *Pythium oligandrum*, et la vigne : étude de l'induction de résistance contre un agent pathogène du bois et impact sur les communautés microbiennes colonisant la plante

Il est actuellement estimé qu'environ 13% du vignoble français est improductif suite aux pathologies affectant le bois des ceps, la principale d'entre elles étant l'esca. Parmi les moyens de lutte mis en œuvre, le biocontrôle, via l'utilisation d'un oomycète, *Pythium oligandrum*, est actuellement développé pour protéger les plants de vigne contre un agent pathogène pionnier de l'esca, *Phaeoconiella chlamydospora*.

La sélection de souches de *P. oligandrum*, isolées du vignoble, et produisant *in vitro* des quantités importantes d'une protéine élicitrice, l'oligandrine, des systèmes de défense des végétaux a d'abord été réalisée. Trois essais en serre ont montré qu'une réduction significative (40 à 50%) des nécroses dues *P. chlamydospora* était observée après application d'inocula de l'oomycète sur les racines des plants de vigne pied-francs Au niveau de la tige, le niveau d'expression de 22 gènes impliqués dans les mécanismes de défenses de *Vitis vinifera* a été mesuré par PCR quantitative et des réponses spécifiques du végétal ont été observées selon les traitements. Six gènes (protéines PR, voie des phenylpropanoïdes, oxylipines et le système d'oxydo-réduction) ont été fortement induits lorsque les plants ont été pré-inoculés par *P. oligandrum* puis infectés par *P. chlamydospora*.

Afin de mettre en évidence les mécanismes spécifiques mis en place lors de cette interaction tripartite, l'analyse de la réponse transcriptomique globale de la vigne (par microarray et RNAseq), au niveau de la tige, a été réalisée chez ces plants qui manifestent une résistance induite systémique (ISR). Plusieurs gènes impliqués dans la synthèse de l'éthylène et des jasmonates sont fortement induits, chez les plants pré-traités par l'oomycète puis infectés par l'agent pathogène. Plusieurs facteurs de transcription régulant ces voies de signalisation sont également fortement induits. Suite à l'analyse des populations de messagers (mRNA) de *P. chlamydospora*, il a été observé que les niveaux d'expression de gènes impliqués dans la synthèse des métabolites secondaires, des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de différentes voies chez les champignons et certaines Carbohydrates Actives enZymes étaient modulés en présence de *P. oligandrum* au niveau racinaire. Ces résultats montrent que la colonisation du végétal par l'oomycète, même à distance de *P. chlamydospora*, induit un stress indirect important chez celui-ci.

Afin d'optimiser l'implantation de cet agent de biocontrôle en pépinière et au vignoble, l'aptitude de *P. oligandrum* à coloniser les racines de plants de vignes greffés et à les protéger contre *P. chlamydospora* a été étudiée. Trois portes-greffes (SO4, 3309 et 101-14) greffés sur des cépages (Cabernet Sauvignon et Sauvignon Blanc) ont été inoculés ou non par *P. oligandrum*. L'oomycète s'implantait sur les différents systèmes racinaires, mais en proportion variable selon les associations cépage/porte-greffe utilisées. Les analyses par empreintes moléculaires (Single Strand Conformation Polymorphism) ont montré que des microflore fongiques et bactériennes complexes et diversifiées colonisaient les feuilles et les racines, mais que l'introduction de *P. oligandrum* sur la plante n'induisait pas de bouleversements directs ou indirects notables au niveau de ces microflore indigènes. Une protection des jeunes plants de vigne greffés (SO4 + Cabernet Sauvignon) semble être induite par *P. oligandrum* contre l'agent pathogène, *P. chlamydospora*.

Mots clés: biocontrôle, *P. oligandrum*, esca, maladie du bois, *P. chlamydospora*, résistance systémique induite, plants greffés

Relationships between the oomycete, *Pythium oligandrum*, and grapevines: induced resistance against a trunk wood pathogen and impact on plant microbial communities

Approximately 13% of French vineyards are currently considered unproductive due to trunk diseases, mainly Esca, a particularly destructive disease that affects grapevines worldwide. Accordingly, biological control of a pathogen implicated in Esca, *Phaeomoniella chlamydospora*, was developed using the oomycete, *Pythium oligandrum*.

The selection of *P. oligandrum* strains, isolated from vineyards, which produced *in vitro* large quantities of oligandrin, an elicitor-like protein inducing plant defences, was carried out. Three greenhouse assays showed that the necroses caused by *P. chlamydospora* were significantly reduced (40 to 50%) when *P. oligandrum* colonized the root system of vine cuttings. At stem level, the expression of a set of 22 genes involved in *Vitis vinifera* defence mechanisms was measured by quantitative PCR. Depending on the treatments employed, significant differences in grapevine responses were observed. Six of the genes (PR proteins, phenyl-propanoid pathway, oxylipins and the oxydo-reduction system) were strongly induced in plants pre-treated with *P. oligandrum*, and subsequently infected by *P. chlamydospora*.

In order to characterize the mechanisms occurring during this tri-partite interaction, the global transcriptomic grapevine responses at stem level were analysed, using microarray and RNAseq, in plants in which induced systemic resistance (ISR) had taken place. Several genes involved in ethylene and jasmonate biosynthesis were strongly induced in plants that were pre-treated with *P. oligandrum*, and subsequently infected by *P. chlamydospora*. The transcription factors involved in the regulation of these signalisation pathways were also induced. Analysis of the *P. chlamydospora* RNA messenger (mRNA), showed that certain genes involved in secondary metabolite synthesis, transcription factors implicated in pathway regulations, and certain Carbohydrate Active enZymes, were modulated, when *P. oligandrum* colonised the roots. These results demonstrated that root inoculation with *P. oligandrum* induced indirect stress on *P. chlamydospora* responses.

In order to promote *P. oligandrum* implantation in nurseries and vineyards, the capacity of this biocontrol agent to colonize the roots of grafted-plants, and to protect them against *P. chlamydospora* attacks, was studied. Three rootstocks (SO4, 3309 and 101-14), grafted on two scion varieties (Cabernet Sauvignon and Sauvignon Blanc), were inoculated or not with *P. oligandrum*. Depending on the particular scion/rootstock associations, the oomycete colonized the various root systems differently. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) analyses revealed complex and diverse fungal and bacterial communities in both the rhizosphere and the phyllosphere. These microflora, which were organ-dependent, were not directly or indirectly affected by the root inoculation of *P. oligandrum*. Protection of grafted vines (SO4 + Cabernet Sauvignon) was probably induced by *P. oligandrum* against the pathogen, *P. chlamydospora*.

Keywords: biocontrol, *P. oligandrum*, esca, grapevine trunk diseases, *P. chlamydospora*, induced systemic resistance, grafted plants

Glossaire

ACC : Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique	MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
AJ : Acide jasmonique	MAPK : MAPK kinase
ANTS : Anthranilate synthase	MCBL : Microscopie confocale à balayage laser
AP2/EREBF : <i>Apetala2</i> / ethylene-responsive element binding factor	MDB : Maladies du bois
ARNm : ARN messagers	MeJA : Méthyl jasmonate
ADNc : ADN complémentaire	MYB : Myéloblastose
AS : Acide salicylique	NBS : Nucleotide binding site
bHLH : Basic helix loop helix	NRPS : Nonribosomal peptides
BTH : benzothiadiazole	PAL : Phénylalanine ammonia-lyase
CAGT : Coniferyl alcohol glucosyl transferase	PAMP : Pathogenic-associated molecular pattern
CALS : Callose synthase	PER : Peroxydase
CBS : Centraalbureau voor Schimmelcultures aux Pays-Bas	PFA : Paraformaldehyde
CHIT3 : Chitinase de classe 3	PGIP : Protéine inhibant les polygalacturonases
CHIT4 : Chitinase de classe 4	PIN : inhibiteur de protéase
CHORM : Chorismate mutase	PRR : Pattern-recognition receptor
CHORS : Chorismate synthase	PTI : PAMP-triggered immunity
CHS : Chalcone synthase	PVPP : Poly-vinyl poly-pyrrolidone
CT : Cycle threshold	RH : Réaction d'hypersensibilité
CTAB : Céthyl triméthyl-ammonium bromide	Rpm : Rotations par minute
CWP : Cell wall protein	SAR : Résistance systémique acquise
EDTA : Ethylène diamine tétracétique	STS : Stilbène synthase
EF1γ : Chaîne γ du facteur d'élongation 1	TNH2 : Tryptamine
ET : Ethylène	
ETI : Effector-triggered immunity	
FAO : Forme active de l'oxygène	
FORL : <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Radicis-lycopersici</i>	
GAPDH : Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase	
GLU : β 1-3 glucanase	
GST : Glutathione S-transférase	
HPLC : Chromatographie liquide haute performance	
ISR : Résistance systémique induite	
JPI : Jour post inoculation	
LOX-9 : Lipoxygénase-9	
LRR : Leucine reach repeat	
MAMPs : Microbial-associated molecular pattern	

Sommaire

Contexte de l'étude	1
Synthèse bibliographique	3
Publication n°1.....	26
Biological control of major grapevine foliar, grapes and trunk diseases using fungi and oomycetes	
Objectifs et démarche	84
Chapitre I	88
Interaction <i>Pythium oligandrum</i> , <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> et vigne : étude de l'induction de résistance chez des plants pied-francs	
I.1. Publication n°2	91
Ability of <i>Pythium oligandrum</i> strains to protect <i>Vitis vinifera</i> L., by inducing plant resistance against <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> , a pathogen involved in Esca, a grapevine trunk disease	
I.2. Publication n°3	108
High-throughput transcriptional analyses of a tri-partite interaction between an oomycete biocontrol agent, <i>Pythium oligandrum</i> , a pathogen, <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> , involved in Esca, a Grapevine Trunk Disease, and <i>Vitis vinifera</i> L	
I.3. Etude de l'interaction <i>P. oligandrum</i> , <i>V. vinifera</i> et <i>P. chlamydospora</i> par microscope confocale à balayage laser	149
Chapitre II	159
Interaction <i>Pythium oligandrum</i> , <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> et vigne : impact sur la microflore indigène et étude de l'induction de résistance chez des plants greffés	
II.1. Colonisation racinaire de plants de vigne par <i>P. oligandrum</i> et influence sur les communautés microbiennes colonisant la vigne	161
II.2. Protection induite par <i>P. oligandrum</i> chez des plants greffés de vigne contre l'attaque par <i>P. chlamydospora</i>	184
Conclusions générales et Perspectives	205
Références Bibliographiques	216

Contexte de l'étude

La viticulture occupe une place importante dans l'agriculture française et avec un chiffre d'affaires global de près de 18,7 milliards d'euros en 2013, soit plus de 15% de la valeur de la production agricole, la part du vin et autres produits dérivés dans l'économie et la balance commerciale de la France, est significative. La filière viti-vinicole est aussi importante au niveau de l'emploi puisqu'elle génère 600 000 emplois directs et indirects. Cette culture est cependant, de façon similaire aux crises sanitaires (oïdium, phylloxera, mildiou) de la fin du XIX^{ème} siècle, actuellement à la croisée des chemins faisant face à de profonds bouleversements induits cette fois par l'évolution du climat, une nouvelle crise majeure, l'épidémie des maladies du bois (MDB) de la vigne, *i.e.* esca, eutypiose et dépérissements à *Botryosphaeriaceae*, et de fortes attentes sociétales pour une viticulture respectueuse de l'environnement. Les MDB, décrites depuis l'Antiquité, étaient connues comme atteignant des ceps généralement âgés et elles n'induisaient souvent que des dégâts peu importants. Elles sont cependant devenues ces deux dernières décennies l'objet de préoccupations majeures pour la filière viti-vinicole (Bertsch et al., 2013 ; Mugnai et al., 1999). Le vignoble mondial est atteint et en France toutes les régions viticoles sont touchées. Les MDB ne cessent de progresser et actuellement environ 13% du vignoble français est improductif, principalement à cause de l'esca (Grosman and Doublet, 2012). Cette situation génère de fortes inquiétudes comme en témoigne les manifestations de viticulteurs ces dernières années ou les interventions politiques à l'Assemblée Nationale sur ce sujet.

Cette épidémie est souvent associée à l'interdiction d'utilisation de l'arsénite de soude depuis 2001, seule molécule homologuée pour lutter contre les MDB, même si certains auteurs relativisent son efficacité réelle (Fussler et al., 2007), les MDB ayant aussi progressé dans les pays où cette molécule n'a jamais été utilisée (Allemagne, Suisse). A l'exception d'un produit de biocontrôle nommé Esquive, à base de *Trichoderma atroviride*, aucun produit phytosanitaire n'est actuellement homologué en France. Pour les différents acteurs de la filière viticole, la mise au point de nouvelles méthodes de lutte est donc un point crucial qui permettra de préserver la pérennité du vignoble. Aujourd'hui seules des méthodes prophylactiques (de la pépinière au vignoble) sont préconisées. Les acteurs du développement viticoles s'attachent à favoriser les pratiques viticoles, *e.g.* taille non mutilante ou respectant les trajets de sève dans les ceps, limitant le développement des maladies du bois. Cependant compte tenu de la multiplicité des modes de conduite, des cépages et des contextes environnementaux, les résultats actuels restent fragmentaires, parfois contradictoires, et peu

transposables à toutes les situations. Dans ce contexte, la présente thèse s'inscrit dans un projet développé à l'UMR SAVE qui vise à utiliser un oomycète colonisateur de la rhizosphère des ceps de vigne et qui est connu pour ses capacités d'agent de biocontrôle, *Pythium oligandrum*. L'étude des relations qu'il établit avec : (i) les plants de vigne pour induire les systèmes de défense du végétal, et (ii) avec la microflore colonisant la rhizosphère va constituer le centre de cette étude. Ces points sont en effet cruciaux pour développer un produit de biocontrôle efficace pour lutter contre l'esca.

Synthèse bibliographique

1. La vigne

1.1. Généralités

La vigne cultivée, *Vitis vinifera* L., est une plante angiosperme dicotylédone appartenant à la famille des *Vitaceae*. Elle est cultivée pour ses fruits charnus, les baies, qui peuvent être consommées sous forme de fruits frais ou sec. Le jus de raisin et ses produits transformés, *i.e.* les vins et eaux de vie, ont fait le succès et la réputation de cette plante depuis l'Antiquité.

Vitaceae a 14 genres différents (Ren et al., 2011), dont *Vitis* qui est le seul utilisé pour l'alimentation humaine. *Vitis* comporte deux sous-genres : *Muscadinia* et *Euvitis* qui présentent des caractères anatomiques, morphologiques et cytologiques distincts. La quasi-totalité des cultivars, ou cépages, cultivés appartiennent au sous-genre *Euvitis*, ils sont appelés américains, asiatiques ou européens en fonction de leur origine géographique. Les cépages américains, *e.g* *Vitis labrusca*, *V. riparia*, *V. rupestris*, soit une vingtaine au total, sont résistants aux principales maladies de la vigne et sont utilisés comme porte-greffes dans 85% du vignoble mondial. Les cépages asiatiques sont par contre peu résistants aux maladies. *V. amurensis* est l'espèce la plus connue de ce groupe. L'espèce *V. vinifera* se divise en deux archétypes, *V. vinefera sylvestris* et *V. vinifera sativa* qui est la seule utilisée pour produire du vin, les principaux cépages cultivés étant : Cabernet Sauvignon, Sauvignon Blanc, Merlot, Ugni Blanc, etc.

1.2. Importance économique de la filière viti-vinicole dans le monde et en France

En 2014, la superficie viticole mondiale était de 7573 milliers d'hectares dont 13,7% en Espagne, 10,55% en Chine, 10,4% en France, 9,1% en Italie et 6,6% en Turquie. La production mondiale de raisins destinés à tous types d'utilisations était de 737 millions de quintaux. En détail cette production était par pays de : 15% en Chine, 9,4 % aux Etats-Unis, 9% en France, 9% en Italie et 9% en Espagne. Celle de vin (hors jus et moûts) a atteint 270 millions d'hectolitres dont 17% en France, 16% en Italie, 15% en Espagne, 8% aux Etats-Unis, 6% en Argentine, 4% en Chine) (OIV, 2015).

En France, la filière viti-vinicole est un secteur économique et historique très important. Son activité génère 600 000 emplois directs ou indirects (17 régions françaises sur 22 sont productrices de vin), elle est le 1^{er} secteur agroalimentaire excédentaire et le 2^{ème} excédentaire, après l'aéronautique, tous secteurs d'activités confondus. La valeur des

exportations a été estimée à 7,6 milliards d'euros pour les vins en 2013 (OIV, 2014), soit la plus importante dans le monde. Compte tenu de ces enjeux très forts, les problèmes phytosanitaires, ou autres, qui affectent cette production mettent en danger un secteur très important pour l'économie française.

1.3. Le développement de la vigne

Le cycle annuel de la vigne est composé de deux phases : une qui assure le développement de l'appareil végétatif et l'autre qui conduit à la formation des fleurs puis des fruits.

La croissance végétative se déroule du printemps à l'automne, le repos végétatif ayant lieu durant l'hiver, *i.e.* novembre à février, lorsque les plantes entrent en dormance et que la circulation de la sève cesse. A partir de mars/avril, l'écoulement de la sève brute à la surface des plaies de taille, appelé aussi période des « pleurs », annonce la reprise de l'activité de la vigne qui commence par le débourrement des bourgeons et l'émergence des premières feuilles. Cette étape se caractérise par le gonflement des bourgeons latents et le début de la croissance des rameaux et des organes reproducteurs. La phase de croissance a lieu jusqu'à la fin juillet, elle correspond à l'allongement des rameaux et au développement des feuilles. Durant la période d'août à novembre, afin de préparer la vigne aux conditions défavorables de l'hiver, un dépôt de lignine (ou aoûtement) rend les rameaux plus dur et épais. L'aoûtement des sarments est suivi par la chute des feuilles et l'entrée en dormance. On peut noter que la vigne est une plante ligneuse pérenne qui est capable de se multiplier par voie sexuée ou asexuée (bouturage et greffage) en pépinière (Gary et al., 2003).

La reproduction sexuée

Le cycle reproducteur de la vigne est biennuel, car l'initiation florale dans les bourgeons latents se produit environ un an avant la floraison. Les inflorescences se développent peu après le débourrement. La floraison a lieu entre mai et juin et aboutit à la libération du pollen. La vigne est une plante hermaphrodite (fleurs mâles et femelles sur la même plante). La fécondation peut être assurée par autofécondation ou allogamie (pollen provenant d'une autre plante) (Galet, 2000). Après fécondation, l'ovaire commence à se développer et lors du stade de nouaison la grappe se forme et le fruit est dit « noué ». Au mois d'août, c'est le stade de véraison qui correspond à la fin de la phase herbacée et au début de la maturation des baies qui changent alors de couleur. En fonction des cépages, les baies

atteignent leur pleine maturité entre la fin août et la fin septembre, elles peuvent alors être vendangées. Par la suite les baies entrent dans une phase de sur-maturation qui se termine par leur flétrissement.

La reproduction asexuée en pépinière

La vigne est propagée essentiellement par multiplication végétative et le type de reproduction asexuée le plus utilisé est le bouturage. Lors de la multiplication des vignes il faut aussi tenir compte du fait que *V. vinifera* présente une forte sensibilité au phylloxéra. Ainsi afin de protéger les plants des attaques par cet insecte, les cépages européens ont été greffés sur des porte-greffes américains résistants (Forneck et al., 2002). La fabrication de plants greffés se fait actuellement de façon industrielle en pépinière, plusieurs étapes sont nécessaires et chacune d'entre elles sont décrites ci-après :

(i) la première étape consiste à prélever, en janvier/février, les sarments à partir des vignes mères de greffons et de porte-greffes. Les boutures, sous forme de branches, sont collectées et chaque sarment est débité à un « œil » pour les greffons et en fragments de tailles différentes, selon le type de plants à produire, pour les porte-greffes. Les sarments collectés sont stockés dans des chambres froides humides (environ 4°C) pour éviter leur déshydratation (Gramaje et Armengol, 2011), puis ils sont conservés jusqu'au printemps.

(ii) Le greffage, l'étape clé de la production des plants greffés, a lieu au mois de mars. Elle consiste à assembler avec une machine à greffer la future partie aérienne de la vigne, ou greffon, à la partie à l'origine des racines, c'est-à-dire le porte-greffe. Pour la greffe dite oméga, qui est la plus fréquente, la zone de jonction rappelle la forme de cette lettre grecque (Ω), d'où le nom. La zone de greffe est recouverte de paraffine pouvant contenir des hormones de croissance végétales et des fongicides afin de favoriser la reprise des plants et la protection contre les infections fongiques.

(iii) Les plants sont disposés dans des caisses remplies de sciure et recouvertes d'une toile. Ils sont alors placés dans un environnement chaud (28°C) et humide (70%) pendant 2 à 3 semaines. C'est l'étape de stratification dont l'objectif est de favoriser la cicatrisation du point de greffe entre le greffon et le porte-greffe.

(iv) Lorsque le cal de soudure est formé, le forçage va consister à favoriser la croissance des racines et de la tige. Cette étape consistera à placer les jeunes plants greffés dans des pots biodégradables et à les faire pousser dans des conditions optimales de

croissance, *i.e.* lumière, chaleur et humidité optimales. Les plants seront commercialisables lorsque des racelles auront poussé autour du pot. A titre d'exemple, en Aquitaine, environ 20 millions de plants sont greffés chaque année (<http://www.gironde.chambagri.fr>).

2. Les principales maladies fongiques de la vigne

La vigne est une plante sensible à une large gamme d'agents pathogènes, *e.g.* champignons, bactéries, virus, phytoplasmes. Le vignoble français a été dévasté à plusieurs reprises à la fin du XIX^{ème} siècle suite à l'introduction, en provenance d'Amérique du Nord, de plusieurs bioagresseurs : un agent pathogène d'origine fongique, l'oïdium en 1848, un oomycète, le mildiou en 1878, et un ravageur, le phylloxera en 1863. D'autres bioagresseurs s'attaquent à la vigne et provoquent des dégâts importants, *e.g.* *Botrytis cinerea* l'agent de la pourriture grise, *Guinardia bidwellii* l'agent du black-rot, etc.

Concernant les parties aériennes (feuilles et grappes) de la vigne, les 3 principales maladies observées en France sont le mildiou, l'oïdium et la pourriture grise. Elles sont décrites ci-après.

2.1. Les principales maladies aériennes chez la vigne

*Le mildiou causé par *Plasmopara viticola**

Le mildiou de la vigne est une maladie invasive originaire du nord-est des Etats-Unis qui a été introduite accidentellement en France en 1878 lors d'importations de porte-greffes américains utilisés pour lutter contre le phylloxera. Cette maladie est provoquée par un oomycète biotrophe, *Plasmopara viticola* (Berk. et Curtis ex. de Bary) Berl. et de Ton. C'est un parasite obligatoire qui se développe sur tous les organes herbacés de la vigne, les feuilles, les vrilles ou bourgeons et les grappes. En l'absence de traitements et dans des conditions climatiques favorables (températures entre 15 et 20°C et des précipitations d'au minimum 10 ml), le mildiou de la vigne peut causer des dégâts avoisinant 75% de perte de la récolte annuelle. Delière et al. (2010) ont démontré que les fortes attaques de mildiou entraînaient une diminution des réserves de la plante et un affaiblissement de sa vigueur l'année suivante. Les premiers symptômes apparaissent sur les feuilles sous forme de taches jaunâtres et d'aspect huileux sur la face supérieure alors que la face inférieure se recouvre d'un duvet blanchâtre qui correspond aux fructifications de l'oomycète (figure 1 A et B). Les feuilles atteintes ont de nombreuses taches rouges ou brunes et elles finissent par tomber prématurément (figure 1 C). Lors de la floraison, les symptômes apparaissent sur les grappes.

Il y a d'abord un brunissement et une déformation des rafles, puis les baies présentent des taches brunes à noirâtres, (figure 1 D). Les jeunes rameaux et les vrilles atteints portent des taches brunes plus ou moins allongées.

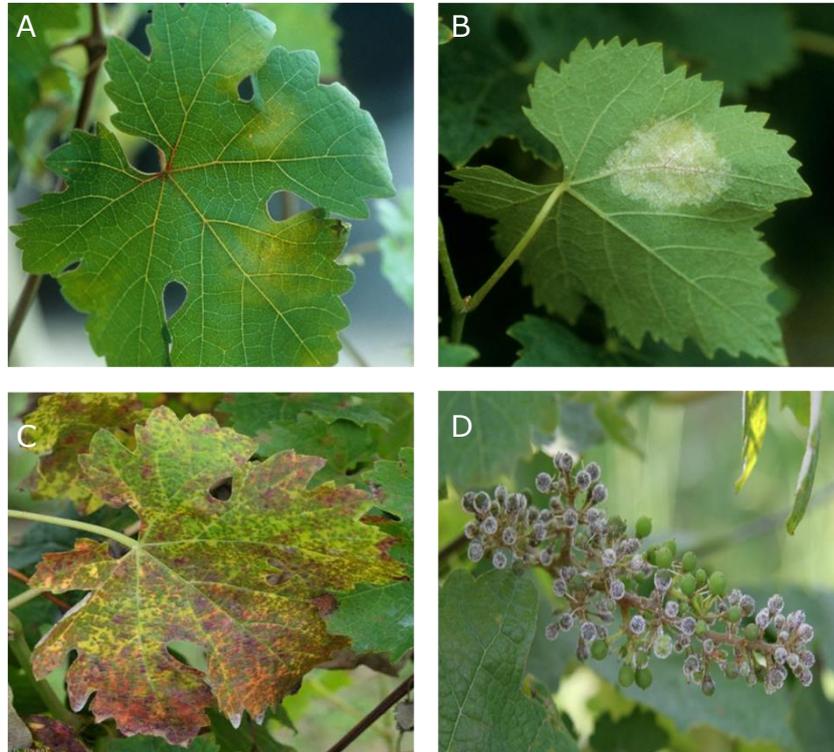


Figure 1 : Les symptômes du mildiou. Tâches d'huile sur la face supérieure de la feuille (A) visible en début de saison et feutrage blanc observable sur la face inférieure de la feuille (B). Symptôme mosaïque de mildiou sur la face supérieure de la feuille observable en fin de saison (C). Fructifications de *Plasmopora viticola* sur les grappes (ephytia, INRA)

*L'oïdium causé par *Erysiphe necator**

L'oïdium de la vigne est une maladie originaire d'Amérique du Nord qui a été introduite en France en 1845. Cette maladie est causée par un champignon ascomycète *Erysiphe necator* (Schw.) Burr, anciennement appelé *Uncinula necator*. Il s'agit d'un parasite biotrophe obligatoire, exclusif au genre *Vitis*. Les conditions optimales pour le développement de ce champignon sont des températures entre 25°C et 30°C avec une humidité relative de 80%. *E. necator* affecte négativement la production au vignoble, il peut entraîner des pertes de production très importantes et altérer la qualité des raisins (Galet, 1999). Comme pour le mildiou, cet ascomycète s'attaque à tous les organes verts de la vigne, en particulier aux jeunes baies en croissance. La maladie se manifeste initialement sur les feuilles par des

petites tâches éparses, duveteuses qui se développent sur la face inférieure (figure 2 A), puis supérieure des feuilles (figure 2 B). Les feuilles fortement attaquées ont le bord du limbe qui s'enroule vers le haut et des tâches blanc grisâtres, poudreuses, apparaissent sur les deux faces de la feuille (figure 2 C). Les inflorescences et les baies de raisin peuvent être attaquées au moment de la floraison jusqu'au stade fermeture de la grappe. Les baies se couvrent d'une poussière blanchâtre, se fendillent et finissent par éclater (figure 2 D). Calonnec et al. (2004) ont montré que la présence de grappes attaquées par l'oïdium altère la qualité des vins.

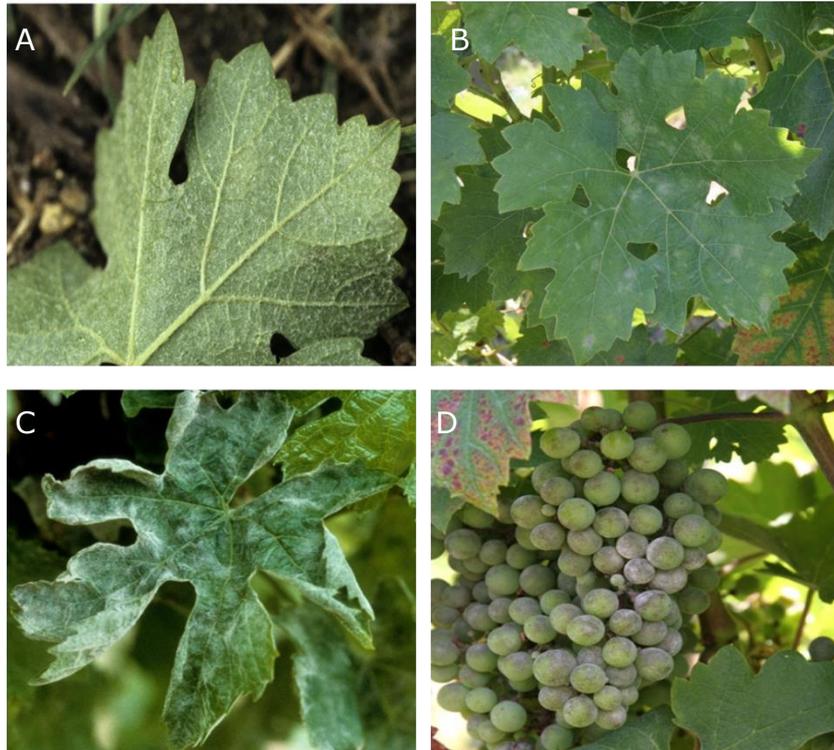


Figure 2 : Les symptômes de l'oïdium. Tâches duveteuses sur la face inférieure (A) et sur la face supérieure de la feuille (B). Symptôme sur feuilles fortement attaquées par l'oïdium (C). Les baies se couvrent d'une poussière blanchâtre (D) (ephytia, INRA)

La pourriture grise causée par Botrytis cinerea

La pourriture grise est une maladie causée par le champignon ascomycète *Botrytis cinerea* (Pers. ex Fr., 1832) (forme asexuée) qui est connue depuis l'Antiquité. Il s'agit d'un champignon ubiquiste, polyphage, se situant à la limite du saprophytisme et du parasitisme. Il peut d'abord se développer comme un saprophyte sur des tissus morts, avant de devenir nécrotrophe sur les parties vivantes du végétal (Viret et Siegfried, 2000). Au printemps, l'attaque des feuilles se manifeste par la formation de tâches rouges brunes, à la périphérie du limbe (figure 3 A). Les inflorescences, une fois attaquées, se dessèchent et tombent (figure 3

B). *B. cinerea* peut infecter les baies dès la véraison et envahir totalement la grappe qui se recouvre de conidiophores et prend une coloration marron (figure C et D). Une humidité relative avoisinant 90 à 95 % et des températures comprises entre 17 et 23°C sont des conditions très favorables aux attaques par *B. cinerea*. Les pertes de rendement causés par cette maladie peuvent atteindre 40% et les qualités organoleptiques des vins sont affectées (Darriet et al., 2001). Une exception notable à cette observation est faite dans certains vignobles comme ceux du Sauternais (région de Bordeaux) ou du Tokay (Hongrie), où des baies botrytisées sont utilisées pour faire des vins liquoreux d'une exceptionnelle qualité organoleptique.

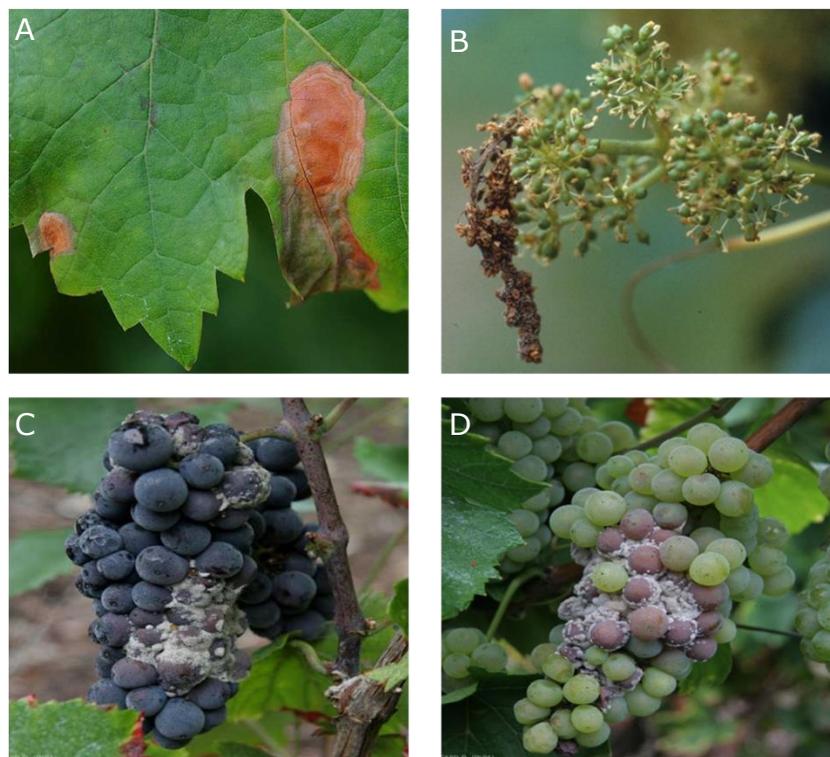


Figure 3 : Les symptômes de la pourriture grise. Tâches rouges brunes à la périphérie du limbe (A). Dessèchement des inflorescences (B). Les grappes se recouvrent de conidiophores et prennent une coloration marron (C et D) (ephytia, INRA).

2.2. Les maladies du bois de la vigne

Les maladies du bois (MDB) de la vigne, *i.e.* esca, eutypiose et chancres à Botryosphaeriaceae, sont devenues en l'espace d'environ vingt ans l'objet de préoccupations majeures pour la filière viti-vinicole en France et dans le monde (Bertsch et al., 2013). Ces pathologies provoquent des pertes économiques non négligeables et il est actuellement estimé qu'environ 13% du vignoble français est improductif à cause de ces maladies, principalement l'esca. Le coût des pertes imputées aux MDB a été estimé à 1 milliard d'euros en 2014 en France (Thierry et Rey, 2015).

L'expression des MDB dépend de facteurs biotiques, *i.e.* la présence du/des pathogène(s), la tolérance du porte-greffe ou du cépage, mais aussi abiotiques, *i.e.* le climat variant selon la position géographique et l'année, la date de taille et de récolte (Kuntzmann et al., 2013). Le taux de ceps présentant des symptômes varie avec ces facteurs abiotiques et biotiques. L'âge de la vigne est un facteur important dans la sensibilité aux MDB. En effet, les pieds âgés sont souvent plus touchés notamment à cause de la multiplication des plaies de taille qui sont des portes d'entrée pour les micro-organismes pathogènes (Larignon, 2012).

L'eutypiose

L'eutypiose est due à un champignon ascomycète de la famille des Diatrypacées, *Eutypa lata*. Cet agent fongique a été identifié sur la vigne par Moller et Kasimatis en 1978. Dénommé à cette époque *Eutypa armeniacae*, le terme définitif d'*E. lata* a été donné par Rappaz en 1984. Il existe une forme asexuée (ou forme imparfaite) et une sexuée (ou forme parfaite) du champignon. La forme asexuée appelée *Libertella blepharis* est caractérisée par la présence de pycnides regroupées dans un stroma. Ce sont des fructifications globuleuses de 300 à 500 µm de diamètre, prolongées par un ostiole conique obtus, s'ouvrant par un pore (Cortesi et al., 2001). Ces pycnides contiennent les pycnidiospores qui ne semblent pas jouer de rôle dans la propagation de la maladie en raison de leur difficulté à germer (Ju et al., 1991 ; Moller et al., 1978). La forme sexuée d'*E. lata* est l'agent causal de la maladie. Le cycle du champignon n'est pas complexe mais il nécessite une longue période pour s'accomplir. Cet ascomycète forme souvent ses fructifications sexuées, appelées périthèces, à la surface du bois de ceps morts depuis plus de 2 ans. Les périthèces contiennent de nombreux asques cylindroclaviformes. Chaque asque contient 8 ascospores allantoides de couleur brun-jaune (Paillassa et al., 1992). Les périthèces n'apparaissent que dans les régions où la pluviosité annuelle dépasse 350 mm. Au vignoble, deux heures après le début d'une pluie, les

ascospores sont libérées des périthèces (forme de conservation du champignon sur les ceps) et se disséminent. Le vent assure leur dissémination sur une très grande distance, jusqu'à 60 km. L'optimum de germination des ascospores se situe entre 22 et 25 °C. *E. lata* est un parasite de blessures, en effet les plaies de tailles et les blessures dues au gel sont les cibles des ascospores qui germent au niveau des vaisseaux du xylème. Par la suite, le champignon progresse de manière extrêmement lente dans le bois. Cet agent pathogène attaque exclusivement le tronc et les bras des ceps, il n'a jamais été observé dans les rameaux herbacés (Bernard et Mur, 1986). L'apparition de symptômes dans tout l'appareil végétatif du cep implique la production de toxines comme l'eutypine (hydroxy-4 (methyl-3butène-3 ynyl-1)-3 benzaldéhyde) qui est transportée dans la sève brute et est spécifiquement détectée dans les ceps infectés (Tey-Ruhl et al., 1991). Cette toxine est détectée dans la sève, les feuilles, les tiges et les inflorescences des plantes infectées, par contre, elle est absente chez les tissus sains (Deswarte et al., 1994).

L'eutypiose provoque le dessèchement des inflorescences (Creaser et al., 2000), ce qui engendre la chute du nombre de grappes par cep. Elle affecte la maturation du fruit et la biosynthèse des composés impliqués dans l'arôme des vins (Wicks et al., 1999).

Les symptômes apparaissent au printemps. Ils touchent toute la plante, ou un seul bras ou quelques rameaux. Il convient de noter l'extrême variabilité de l'expression des symptômes d'une année à l'autre. En effet, un pied malade une année peut apparaître sain l'année suivante (Moller et al., 1978). Au printemps, les pousses développées à partir d'un bras infecté ont une croissance chétive, rabougrie et les entre-nœuds sont très courts (figure 4 A). (Moller et al., 1978). Les feuilles sont nettement plus petites que la normale, chlorotiques, tantôt enroulées, tantôt déformées et déchiquetées. Dans les cas les plus graves, elles portent des nécroses marginales (figure 4 B), puis sèchent complètement et tombent (Duthie et al., 1991). Les grappes ont un aspect normal jusqu'à la floraison, par la suite des coulures et un dessèchement complet sont observés. Au niveau du bois, cette maladie se caractérise par la formation de tissus nécrosés durs et de couleur brune qui ont une position sectorielle (figure C).

Cette maladie est présente dans de nombreux vignobles du monde, elle entraîne des pertes économiques principalement en Australie et en Californie où cela a été évalué à 260 millions de dollars américains (<http://www.sardi.sa.gov.au>). En France la région viticole du Cognac est la plus touchée avec 20% des ceps atteints en 2004, mais cette maladie a

régulièrement baissé pour atteindre environ 10% en 2014. Les autres régions françaises sont peu touchées par l'eutypiose.



Figure 4 : Les symptômes de l'eutypiose. Rabougrissement de la végétation (A). Nécroses marginale sur feuilles (B). Nécrose sectorielle de couleur brune au niveau du bois (C) (ephytia, INRA).

*Le dépérissement à *Botryosphaeria**

Les espèces de *Botryosphaeria* appartiennent au règne des Ascomycètes, à l'ordre des Botryosphaeriales et à la famille des *Botryosphaeriaceae*. Ces champignons sont très cosmopolites et polyphages. Ils ont été isolés de nombreuses plantes et peuvent provoquer un grand nombre de dépérissements (Slippers et al., 2007).

De nombreux symptômes sont associés à cette maladie sur plante : des tâches foliaires, des pourritures sur fruits, des mortalités de pousses et de bourgeons, une réduction de la vigueur du végétal, un retard de débourrement, le blanchiment de l'écorce ou des décolorations de rameaux. Au niveau du bois, la maladie se manifeste par des nécroses sectorielles et longitudinales qui commencent ou non à partir de blessures (figure 5 A et B). Les stades plus avancés de la maladie se caractérisent par l'apparition de chancres (figure 5C).



Figure 5: Les symptômes du dépérissement à *Botryosphaeria*. Nécroses longitudinales (A). Lésion sectorielle (B). Chancre à *Botryosphaeria* sp. (C) (ephytia, INRA).

Vingt et une espèces de *Botryosphaeria* ont la capacité de créer des symptômes sur vigne (Bertsch et al., 2013). Les espèces de *Botryosphaeriaceae* sont souvent distinguées par le nom de leur forme anamorphe puisque les formes télémorphes sont rares (Denman et al. 2000 ; Crous *et al.* 2006). On distingue 8 espèces appartenant au genre *Neofusicoccum* : *N. parvum*, *N. luteum*, *N. australe*, *N. ribis*, *N. vitifusiforme*, *N. viticlavatum*, *N. macroclavatum* et *N. mediterraneum*, 4 espèces au genre *Diplodia* : *D. mutila*, *D. seriata*, *D. porosa* et *D. corticola*, 4 espèces appartenant au genre *Dothiorella* : *Do. iberica*, *Do. americana*, *Do. sarmentorum* et *Do. viticola*, 4 espèces du genre *Lasiodiplodia* : *L. theobromae*, *L. crassipora*, *L. missouriana* et *L. viticola* et l'espèce *Fusicoccum aesculi*. Ces différentes espèces présentent des niveaux de pathogénicités différents. Par exemple, en considérant la taille des nécroses qu'il provoque, *N. parvum* est souvent décrit comme étant l'espèce la plus virulente (Chen et al., 2014 ; Martos et al., 2008 ; Pitt et al., 2013). De plus, cette espèce est virulente sur tous les continents.

Les *Botryosphaeria* spp. se conservent sous forme de pycnides localisées soit, sur le cep (troncs, bras, plaies de taille) soit, sur les bois de tailles laissés au sol. Lors des périodes humides durant la période végétative, les pycnides libèrent les pycniospores. Ces dernières

sont alors expulsées par les éclaboussures d'eau et vont préférentiellement pénétrer par les plaies de taille dans la vigne. Si les conditions climatiques sont favorables, elles vont se développer et former un tube germinatif suivi d'un mycélium (Kuntzmann, 2008). Les conditions optimales pour la germination des spores sont des températures comprises entre 25 et 30°C. Spagnolo et al. (2014) ont montré qu'en période de floraison, la vigne est plus sensible aux attaques de *N. parvum* et *D. seriata*. Par contre, la germination peut avoir lieu entre 10 et 40°C, ce qui explique la large répartition géographique de ces champignons dans le monde.

Les travaux dédiés à la recherche et à l'identification de molécules toxiques produites par les différentes espèces de *Botryosphaeria* sont peu nombreux. Djoukeng et al. (2009) ont isolé 4 molécules nommées : la mélléine, les 4- et 7-hydroxymélléine et la 4,7-dihydroxymélléine. Ces molécules ont montré une forte toxicité lors de tests sur disques foliaires, mais ces expériences ont uniquement été réalisées en conditions contrôlées. Récemment, Abou-Mansour et al. (2015) ont montré que plusieurs isolats de *N. parvum* produisent des métabolites toxiques similaires qui appartiennent à 4 familles chimiques différentes : les dihydrotoluquinones, les epoxy lactones, les dihydroisocoumarines et les acides hydroxybenzoïque.

Certains champignons de la famille des *Botryosphaericeae*, se révèlent être des agents très agressifs dans certaines situations de stress (Desprez-Loustau et al., 2006). La température peut aussi influencer leur répartition géographique. Úrbez-Torres et al. (2011) ont montré que les conidies des espèces de *Botryosphaeria* infectant la vigne peuvent germer selon une gamme très large de températures, ce qui pourrait expliquer leurs aptitudes pathologiques dans les vignobles de l'hémisphère nord et sud. D'autres facteurs agronomiques tels que la vigueur, la taille et le mode de conduite peuvent également influencer la vulnérabilité de la vigne à ces dépérissements (Larignon et al., 2009).

En France, la maladie appelée Black Dead Arm (BDA), décrite en 2001 par Larignon *et al.*, est associée à différentes espèces de champignons du genre *Botryosphaeria*. Elle a été décrite pour la première fois en Hongrie par Lehoczky (1974) et elle se caractérise par une bande brune à noire située dans le bois du xylème, elle est associée à la présence de *D. mutila*. Certains symptômes foliaires de BDA sur vigne ressemblent à ceux caractéristiques de l'esca et récemment, Lecomte et al. (2012) ont considéré que le BDA serait une variante ou un précurseur de l'esca.

L'esca

L'esca, connu depuis l'Antiquité, est la plus ancienne des MDB décrites sur la vigne. A la fin du XIXe siècle, un lien entre la forme apoplectique où le cep meurt rapidement (quelques jours au maximum) en manifestant un symptôme de dessèchement, et l'attaque de *Stereum hirsutum* a été fait. Ce point est important car il avait permis de distinguer l'esca du folletage qui est une maladie physiologique. Une forme lente de la maladie où les ceps meurent après plusieurs années a été décrite peu après. Le terme esca a été introduit en 1922 et il associe la présence d'une pourriture blanche, ou amadou, à la forme apoplectique.

Suite à ces observations, 2 formes de symptômes foliaires de cette maladie ont été précisément décrites pour la forme « lente » et « apoplectique » (Pascoe et al., 2002). La forme lente se manifeste par l'apparition de symptômes foliaires caractéristiques sur une partie ou sur l'ensemble du pied. Il s'agit de tâches jaunâtres pour les cépages blancs (figure 6 A) ou rougeâtres, bordées de jaune, pour les cépages noirs (figure 6 B). Ces tâches évoluent progressivement vers un brunissement et un dessèchement. Les symptômes foliaires de cette forme sont erratiques, ils peuvent être visibles sur un cep l'année n, disparaître l'année n+1 et réapparaître ou non l'année n+2 (Maher et al., 2012). Une étude récente réalisée par Guérin-Dubrana et al. (2013) a montré qu'un cep exprimant pendant 2 saisons culturales des symptômes foliaires durant une période de 4 années aura statistiquement une forte probabilité de mourir. La forme apoplectique ou foudroyante se manifeste en quelques jours, voire en quelques heures, et aboutit à un dessèchement rapide et complet des sarments et des grappes du pied malade. L'apoplexie est observée lors des périodes de sécheresse (Surico et al., 2000) ou de fort vent (figure 6 C). Elle est due au fait que l'évapotranspiration trop forte durant ces périodes n'est plus compensée par un afflux d'eau suffisant, car il ne reste plus qu'une faible quantité de bois fonctionnel. Par contre, la forme lente est observée pendant les étés doux et pluvieux (Dubos et al., 2004).

Sur la partie pérenne de l'arbre, des coupes réalisées dans des ceps présentant des symptômes foliaires montrent la présence de deux types de nécroses. Une nécrose centrale de couleur claire, entourée d'un liseré foncé ou de tissus brun rose (figure 6A), une nécrose sectorielle claire et tendre et des ponctuations noires (figure 6A). Le bois particulièrement dégradé présente une pourriture blanche ou amadou. Les tissus affectés sont aussi tendres, friables et généralement présents au centre des nécroses (figure 6B).



Figure 5: Les symptômes foliaires de l'esca. Forme lente de l'esca sur cépage blanc (A) et sur cépage noir (B). Forme apoplectique de l'esca (C).



Figure 6: Les symptômes de l'esca au niveau du bois. Nécroses centrale (A). Le bois est dégradé en amadou (B) (ephytia, INRA).

D'une façon globale, la communauté scientifique définit l'esca comme une maladie à l'étiologie complexe où plusieurs facteurs biotiques (micro-organismes pathogènes), abiotiques, écophysiologicals, associés aux pratiques culturales expliqueraient les dépérissements des plantes. Les symptômes foliaires résultent de la dégradation interne des tissus ligneux par des champignons lignicoles (Bertsch et al., 2013 ; Gimenez-Jaime et al., 2006 ; Larignon et al., 2009 ; Maher et al., 2012 ; Rumbos et Rumbou, 2001) dont les principaux sont: *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Fomitiporia mediterranea* et *Botryosphaeria* spp. Ils déstructurent de façon complémentaire le bois pour aboutir aux 2 formes citées ci-avant (Mugnai et al., 1999). Il faut toutefois mentionner que le rôle de ces micro-organismes n'est pas complètement élucidé. En effet suite à l'inoculation des ceps par ces champignons, les nécroses dans le bois sont reproduites, mais l'expression des symptômes foliaires est relativement difficile. On observe aussi que les champignons impliqués dans l'esca peuvent être présents dans le bois sans pour autant provoquer de symptômes.

Les symptômes dans le bois et les feuilles pourraient être dus à une modification de la flore microbienne colonisant les tissus ligneux du cep parallèlement à son vieillissement. Ils pourraient également être dus à une association de pathogènes plus large faisant entrer en jeu des organismes bactériens ayant colonisé les zones du bois. En appui à cette remarque, Bruez et al. (2015) et Haidar et al. (2016) ont montré que selon les associations bactéries-champignons impliqués dans l'esca, le développement des nécroses pouvait être réduit ou augmenté. L'esca affecte couramment les ceps de vigne âgés de 15 à 25 ans, mais des études ont montré que les jeunes plants pouvaient également être atteints (Romanazzi et al., 2009). La dissémination des maladies du bois se fait en étroite relation avec les précipitations (Bertsch et al., 2013 ; Guerin et al., 2005 ; Larignon, 2009), l'eau servant, entre autre, de vecteur de propagation et de sporée. Certains arthropodes se nourrissant de sève sont également capables de véhiculer et de disséminer les spores des agents pathogènes lors de la période de taille (Moyo et al., 2014).

Suite à la recrudescence et à l'augmentation de ces maladies en France vers la fin des années 1990, un Observatoire National des Maladies du Bois avait été mis en place, d'abord sur une période de 6 années (2003-2008), afin de faire un état des lieux et d'évaluer l'évolution des symptômes foliaires, puis dans certaines régions (Jura, Charentes, Bourgogne) jusqu'à la période actuelle. L'Observatoire a disposé de 623 parcelles (300 ceps observés par parcelle) réparties dans les différents vignobles français et 27 cépages avaient été suivis. Les

résultats montraient que, selon les années, 50 à 83 % des parcelles appartenant au réseau avaient manifesté des symptômes d'esca/BDA. Durant la même période, le nombre de ceps atteints par l'eutypiose tendait à régresser (Bruez et al., 2013 ; Grosman et Doublet 2012). Tous les cépages, de toutes les régions viticoles françaises, étaient concernés, même si des différences notables étaient observées (Bruez et al., 2013 ; Grosman et Doublet 2012). Par exemple, le cépage Ugni Blanc est très sensible à l'eutypiose (Charentes) alors que le Savagnin et le Trousseau (Jura) le sont par rapport à l'esca. De plus, certains cépages comme Sauvignon est atteint dans des proportions identiques dans les vignobles de Bordeaux, de Bourgogne et du Centre, alors que le Cabernet-Sauvignon était plus attaqué dans le bordelais que dans la région Provence-Alpes Côte d'Azur. Des observations préliminaires indiqueraient aussi qu'il existe des clones dont la sensibilité est supérieure à la sensibilité globale de la variété (communication personnelle C. Chevrier, Chambre Régionale D'Agriculture du Languedoc Roussillon).

Pour avoir une vue complète de la situation, il faut aussi considérer l'expression aléatoire des symptômes foliaires. Grosman et Doublet (2012) ont rapporté que durant un suivi effectué pendant une période de 10 années dans une parcelle en Bourgogne, l'incidence (nombre de ceps atteints/parcelle) annuelle était basse, 3-4%, mais qu'au total 21% des ceps avaient exprimé des symptômes durant la durée complète de l'essai. Des observations semblables effectuées en Italie par Surico et al. (2000), ont montré que dans une parcelle où l'incidence annuelle de l'esca était de 11% à 19%, l'incidence cumulative était de 50% sur une période de 6 ans. Les mêmes auteurs ont montré que pour 3 parcelles les valeurs pouvaient atteindre 50% (Sienne, période de 11 années), 30% (Ravenne, période de 6 années) et 51% (Florence, période de 5 années).

La sensibilité à l'esca d'une vigne, de même cépage et de même âge, dépend aussi de son environnement pédoclimatique. Les taux d'expression de symptômes les plus élevés sont observés dans les parcelles à fortes réserves utiles (alimentation en eau non limitante) et/ou ayant un statut azoté élevé (azote des limbes) (Guérin-Dubrana et al., 2005). En conditions d'infection artificielle, Edward et al. (2007a, b) ont montré que des plants infectés par un des champignons impliqués dans l'esca deviennent plus vulnérables au stress hydrique, mais la réponse de la plante est variable selon les cépages (Edwards et al., 2007a, b).

L'esca affecte la vigueur (Petit et al., 2006) et la longévité des ceps et présente aussi des conséquences sur la qualité du raisin et sur le produit final, le vin. D'une façon générale, la qualité du vin va dépendre des raisins: de la taille de la baie, de la teneur et de la composition en polyphénols et acides et de son potentiel aromatique. Les travaux de Lorrain et al. (2012) ont montré que l'esca induit des effets particuliers sur la composition phénolique des raisins et des vins. Pour deux millésimes consécutifs (2009, 2010) ces auteurs ont montré que l'esca modifiait le profil phénolique des pépins et des pellicules de raisins. Des diminutions des concentrations de catéchine, d'épicatéchine et d'anthocyanes observées pourraient être attribuées à des perturbations physiologiques de la vigne, ou à une implication de ces composés phénoliques dans les mécanismes de défense de la plante. De plus, un degré de polymérisation moyen des tanins plus faible (fraction polymérique des proanthocyanidines) a été observé dans les pellicules de raisins touchées par l'esca.

Ces maladies auraient donc un impact plus prononcé sur les pellicules que sur les pépins de raisin. Ceci résulte probablement d'un effet indirect des champignons associés à l'Esca (Petit et al., 2006). Ces derniers affectent la physiologie de la vigne, la photosynthèse et pourraient également avoir un rôle sur la voie de biosynthèse des flavonoïdes. De plus, une laccase a récemment été purifiée à partir d'un des champignons agent de l'esca (Luini et al., 2010). Cette enzyme est capable d'oxyder de nombreux composés phénoliques et d'induire un stress oxydatif dans la plante. Ainsi, les proanthocyanidines et les anthocyanes pourraient être impliquées dans des mécanismes de défense de la plante, réagir avec la laccase du champignon et ainsi être dégradées.

En Europe et particulièrement en France, parmi les principaux agents pathogènes, 3 champignons ont été fréquemment décrits : *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* et *Fomitiporia mediterranea*. Leurs caractéristiques sont décrites ci-après :

Phaeomoniella chlamydospora

Ce champignon appartient à la classe des Ascomycètes de la famille des *Herpotrichiaceae*. *P. chlamydospora* P. W. Crous & W. Gams est un champignon pionnier de l'esca, il colonise le bois sain des ceps avant que les nécroses se développent (Bruez et al., 2014). Il est aussi responsable de la maladie de Petri (c'est une maladie vasculaire qui s'attaque aux plants de vignes jeunes âgées de 1 à 10 ans, elle se caractérise par la présence

d'une végétation affaiblie et une taille sous-dimensionnée du tronc). Sa forme sexuée n'est pas connue.

Les pycnides constituent la source d'inoculum de *P. chlamydospora*, elles sont localisées au niveau d'anciennes plaies de taille ou sous l'écorce et libèrent les pycnidiospores par dissémination aérienne. Les spores se développent sur les plaies de taille lors des périodes douces et pluvieuses de l'hiver. Au niveau du bois, le champignon est retrouvé dans la nécrose centrale brune mais du mycélium a également été détecté au niveau des rameaux et des racines, alors que des conidies ont été retrouvées dans la sève brute (Bruno et al., 2007 ; Trocoli et al., 2001).

Plusieurs enzymes sont impliquées dans la pathogenèse de *P. chlamydospora* : des polygalacturonases, polyméthylgalacturonases, β -glucosidases, β -1,4-glucanases, des cellulases, xylanases et des polygalacturonases. Le champignon produit aussi des composés phytotoxiques tels que les exopolysaccharides (Andolfi et al., 2011 ; Bruno et al., 2007 ; Sparapano et al. 2006), le p-hydroxybenzaldéhyde (Tabacchi et al., 2000) et deux néphthalénones (le scytalone et l'isosclérone) (Bruno et Sparapano, 2006).

Phaeocremonium aleophilum

P. aleophilum W. Gams, P. W. Crous, M. J Wingfield & L. Mugnai appartient à la classe des Ascomycètes, à l'ordre des Calosphaeriales et à la famille des *Chaetosphaeriaceae*. Sa forme sexuée est *Togninia minima*. Il est considéré comme un agent pionnier de l'esca. C'est un champignon à dissémination aérienne qui contamine les plaies de taille pendant la période végétative. Le mycélium a été retrouvé sur le tronc et les bras écorcés ainsi que sur les tissus ligneux du tronc et des rameaux (Bruno et al., 2007). Dans le tronc, *P. aleophilum* est retrouvé au niveau du bois brun-rouge et dans la pré-nécrose brune centrale. Il secrète des enzymes capables de dégrader les parois cellulaires : des xylanases, des endo-1,4 β -glucanase et β -glucosidase avec une forte activité amylase. *P. aleophilum* peut également produire certaines molécules de naphtalénones (Andolfi et al., 2011 ; Abou-Mansour et al., 2004). Les déterminants du pouvoir pathogène de cet ascomycète ne sont pas encore bien identifiés.

Fomitiporia mediterranea

F. mediterranea était auparavant nommé *Phellinus punctatus* et *Fomitiporia punctata*. Il appartient à la classe des Basidiomycètes et à l'ordre des Hyménochaetales. C'est un champignon qui intervient pour achever l'œuvre de déstructuration du bois, il participe à la

création de l'amadou où il est majoritaire dans ce tissu dégradé. Dans l'esca, son action sur le bois est donc postérieure à celle de *P. chlamydospora* et *P. aleophilum* (Lardner, 2003). On peut noter qu'il est souvent déjà présent dans le bois sain (Bruez et al., 2014). *F. mediterranea* dégrade complètement les parois cellulaires par le biais d'enzymes ayant une activité lignolytique, *i.e.* phénol-oxydase, laccase et peroxydase, ainsi qu'une activité cellulolytique, *i.e.* endo- 1,4- β -glucanase et β -glucosidase (Lardner, 2003). Le cycle biologique de ce basidiomycète est peu connu. Il se conserve sous forme de basidiomes sur les parties malades de la plante, et se dissémine lorsque les températures sont supérieures à 10°C et le taux d'hygrométrie est supérieur à 80%.

3. Lutte contre les principales maladies fongiques de la vigne

Pour obtenir un état sanitaire optimal et une production de qualité, les viticulteurs ont recours à différents moyens de lutte pour protéger les vignobles. La prophylaxie fait partie des actions possibles, elle permet de réduire les foyers primaires d'agents pathogènes ainsi que les conditions favorables à leur développement. Le travail du sol permet, par exemple, d'enfouir les débris végétaux colonisés par les agents pathogènes et rompt leur cycle de développement. Le labour constitue aussi un moyen important de contrôle des adventices. Une fertilisation adaptée, sans excès, ni manque d'éléments nutritifs, la pratique d'une taille non mutilante de la vigne, c'est-à-dire qui n'induit pas de stress physiologique important pour la plante, sont des moyens efficaces pour limiter la sensibilité des cepes aux bioagresseurs.

La lutte chimique est cependant très fréquemment utilisée pour protéger la vigne et selon les bioagresseurs deux situations très contrastées sont observées :

(i) Contre les maladies du bois, les viticulteurs sont devant une impasse phytosanitaire puisque le seul produit chimique homologué, l'arsénite de soude, a été interdit en 2001 à cause de sa toxicité pour l'homme et l'environnement. Actuellement aucun produit chimique de synthèse ayant un effet curatif ou préventif n'est actuellement homologué (Bertsch et al., 2013 ; Casieri et al., 2009 ; Herlemont et al., 2005).

(ii) A l'inverse, contre de nombreuses autres maladies ou attaques dues aux ravageurs, une réduction du nombre de traitements phytosanitaires est recherchée. En France, en 2013, en moyenne 19 traitements phytosanitaires ont été répandus dans les vignobles. Néanmoins une grande variabilité était observée selon les bassins viticoles, chacun ayant un contexte pédo-climatique, des cépages et parfois des itinéraires techniques dominants différents. Ces

facteurs ont une influence directe sur la pression parasitaire exercée sur la vigne, en conséquence le nombre de traitements chimique appliqué est différent. A titre d'exemple, en 2013 dans les Pyrénées-Orientales le nombre de traitement phytosanitaire était de 11,8 alors qu'il atteignait 23,0 en Champagne.

D'une façon générale, la lutte chimique contre les champignons pathogènes est à l'origine de 79 % des traitements et au moins une application de fongicide est faite sur toutes les surfaces des bassins viticoles. Ces fongicides sont utilisés à 96 % contre le mildiou ou l'oïdium, 3 % contre le botrytis et moins de 1 % contre le black-rot ou d'autres champignons. Le désherbage et les insecticides contre les ravageurs concernent respectivement, 11% et moins de 10% des traitements.

Afin de rationaliser l'utilisation des fongicides dans les vignobles, des modèles de prédiction et de simulations épidémiologiques, les Outils d'Aide à la Décision (OAD) ont été conçus depuis au moins 25 ans. Contre le mildiou (Tran Manh Sung et al., 1990 ; Viret et al., 2001), l'oïdium (Calonnec et al., 2008 ; Carisse et al., 2009) ou ces 2 maladies (Delière et al., 2015), des OAD spécifiques ont été développés, un concept nommé Optidose a ainsi été proposé par l'Institut Français de la Vigne et du Vin pour réduire les doses d'application. Ces modèles sont en permanence améliorés afin d'optimiser les prévisions ainsi que les *applications de produits phytosanitaires au vignoble*.

Lutte biologique ou biocontrôle

La lutte chimique véhicule dans l'opinion publique une image négative liée principalement aux phénomènes de pollution. D'une façon générale, au niveau sociétal et réglementaire, la tendance est défavorable à la lutte chimique. Dans ce contexte, le Grenelle de l'environnement a fixé comme objectif de réduire de 50% d'ici 2025 les traitements avec les produits issus de la synthèse chimique. La recherche de moyens alternatifs est donc d'une urgente nécessité. Dans ce contexte la lutte biologique, ou biocontrôle, est en plein essor et elle constitue une voie possible pour minimiser les nuisances décrites ci-avant. Le biocontrôle est l'ensemble des méthodes de protection des végétaux privilégiant l'utilisation de mécanismes et d'interactions qui régissent les relations entre les espèces dans le milieu naturel. Les produits de biocontrôle peuvent être de quatre types : macro-organismes auxiliaires, micro-organismes, substances naturelles et médiateurs chimiques. Le concept de biocontrôle est devenu un enjeu technologique, économique et politique important pour développer une agriculture durable à un moindre coût écologique.

Les substances naturelles

De nombreuses substances naturelles utilisées pour lutter contre les maladies de la vigne sont des stimulateurs de défense des plantes (SDP). Parmi ces substances utilisées sur la vigne pour stimuler ses défenses contre des attaques fongiques comme le mildiou, oïdium et pourriture grise, il est possible de citer : l'ergosterol (Laquitaine et al., 2006), la limarine (Aziz et al., 2003), les oligogalacturonides (Aziz et al., 2004), le chitosane (Aziz et al., 2006 ; Tortel-Aziz et al., 2006), le benzothiadiazole (BTH) (Dufour et al., 2013). Des extraits de fenugrec ont été aussi employés pour stimuler les défenses de la vigne contre l'oïdium. Les essais réalisés jusqu'à présent en conditions contrôlées au laboratoire sont prometteurs, mais les résultats obtenus sont souvent difficilement reproductibles sur terrain.

Certaines molécules naturelles telles que le chitosane ou la cystéine (Nascimento et al., 2007; Octave et al., 2005) ont montré *in vitro* ou en serre des potentialités de protection intéressantes contre certains champignons associés aux maladies du bois de la vigne.

Les bactéries

Plusieurs bactéries ont été utilisées comme agent de biocontrôle contre les principales maladies fongiques de la vigne (Compant et al., 2013). La plupart des essais ont néanmoins été réalisés pour lutter contre *B. cinerea*. Selon Compant et al. (2013) ce constat s'explique par la relative facilité à cribler des bactéries antagonistes contre ce champignon. Des bactéries appartenant à différentes familles, *Pseudomonadaceae*, *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Actinobacteria* et *Burkholderiaceae* (Compant et al., 2011) ont montré un effet positif pour protéger les vignes contre *B. cinerea*. Tortel-Aziz et al. (2006, 2008) ont, par exemple, évalué le potentiel de certaines bactéries pour contrôler la pourriture grise. Deux cents quatre-vingt deux souches bactériennes ont été isolées de la rhizosphère ou de l'endosphère de plants de vignes sains, et 26 d'entre elles appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter* et *Pantoea* ont démontré une activité inhibitrice (85-100%) de la croissance de *B. cinerea* dans les tests de confrontations directes en boîtes de Pétri. Lors d'essais conduits pendant une période de 4 années, Magnin-Robert et al. (2007) ont montré que les souches bactériennes suivantes : *Pseudomonas fluorescens* PTA-268, PTA-CT2, *Bacillus subtilis* PTA-271, *Pantoea agglomerans* PTA-AF1, *Acinetobacter lwoffii* PTA-113 et PTA-152 réduisaient efficacement les attaques par *B. cinera* au niveau des feuilles et des baies chez des plants de vigne *in vitro*.

D'autres bactéries ont été utilisées afin de lutter contre le mildiou et l'oïdium. Sawant et al. (2011) ont montré que l'application au vignoble pendant 3 années du produit Milastin K, à base de *Bacillus subtilis*, peut protéger les ceps contre une attaque faible ou moyenne par *E. necator*. Abdalla et al. (2011) ont rapporté que la souche ANK313 de *Streptomyces* sp. inhibe la germination des zoospores de *P. viticola*.

Pour ce qui concerne les maladies du bois, des bactéries antagonistes d'*E. lata*, i.e. *B. subtilis* et *Erwinia herbicola*, ont été mises en évidence. *B. subtilis* inhibe le développement de l'ascomycète *in vitro* (Ferreira et al., 1991) et sur des disques de bois (Schmidt et al., 2001). Cette bactérie peut inhiber la croissance du mycélium et la germination des ascospores d'*E. lata*. Elle peut aussi induire des malformations chez les hyphes du pathogène. La bactérie *E. herbicola* a une activité antifongique contre *E. lata in vitro* et sur disques de bois (Schmidt et al., 2001). Le filtrat de culture de cette bactérie contient des sidérophores et des molécules antifongiques, e.g. l'herbicoline ou la pyrrolydine, et il inhibe la croissance de l'agent causal de l'eutypiose sur les fragments de bois. Des tests *in vitro* ont montré que les métabolites produits par *B. subtilis*, souche AG1, inhibent la croissance de *L. theobromae*, *P. chlamydospora* et *P. aleophilum* (Alfonzo et al., 2009).

Les champignons et oomycètes

Cette partie est présentée sous la forme d'une publication intitulée « Biological control of major grapevine foliar, grapes and trunk diseases using fungi and oomycetes » qui va être soumise à Australian Journal of Grape and Wine Research.

Publication n°1

Biological control of major grapevine foliar,
grapes and trunk diseases using fungi and
oomycetes

*Cette publication sera soumise à Australian Journal of Grape
and Wine Research*

Biological control of major grapevine foliar, grapes and trunk diseases using fungi and oomycetes

A. Yacoub ^{a,b,c}, J. Gerbore ^d, S. Compant ^e, R. Guyoneaud ^c, P. Rey ^{b,a,*}

^a INRA, ISVV, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE), F-33140 Villenave d'Ornon, France.

^b Université de Bordeaux, ISVV, UMR1065 SAVE, Bordeaux Sciences Agro, F-33140 Villenave d'Ornon, France.

^c UMR CNRS 5254/IPREM-EEM, IBEAS, Université de Pau et des Pays de l'Adour, 64013 Pau, France.

^d BIOVITIS, 15400 Saint Etienne de Chomeil, France.

^e Bioresources Unit, Health and Environment Department, AIT Austrian Institute of Technology GmbH, Tulln, Austria.

* Corresponding author: prey@bordeaux.inra.fr

Abstract

Grapevine crops, which are present in many countries, are subject to a variety of pathogenic attacks. Emphasis is placed here on the pathogens that, by attacking the leaves, grapes or wood, cause yield losses, affect harvest quality and, in some cases, reduce the span life of vineyards. The main leaf and berry pathogens are grey mould or powdery and downy mildews. The wood pathogens are known as grapevine trunk diseases (GTDs). With the exception of GTDs, these diseases are frequently controlled by chemical pesticides, mostly fungicides, used especially for mildews. Now, however, biocontrol, which is obtained through the use of plant-beneficial fungi and oomycete, is a rapidly developing alternative. These microorganisms, endophytic or not, have been isolated from grapevines, but also from other plants. Their modes of action involve direct antagonism against the pathogens, via mycoparasitism, antibiosis and competition for nutrients. Indirect effect mediated via the plant includes induction of resistance and, in some cases, plant growth promotion. Although many fungi and yeasts have been tested, both in laboratory and field conditions, one oomycete has been particularly used against a major GTD, Esca.

Introduction

Grapevine, *Vitis vinifera* L, with 7573 kha planted throughout the world in 2014 (OIV 2014), is mainly grown for the use of their berries for wine production, which was estimated at 270 million hectolitres in 2014 as well as for fruit juices, and table grapes. Europe is still the top wine producer, with France being the leading country (46.2 mhl), ahead of Italy (44.7 mhl) and Spain (38.2 mhl) in 2014 (OIV 2014). Grapevine is highly subjected, however, to attacks by pathogens, causing yield losses and affecting harvest quality and leading to problem in wine fermentations. Vine plants could be infected and colonized indeed by a large plethora of pathogenic microorganisms, including fungi, bacteria, oomycetes, viruses, and mycoplasma. Among them, fungi and oomycetes represent the most important classes of pathogens affecting grapevine plants. Chemical pesticides are frequently used to control them, as for instance in French vineyards where the number of pesticide treatments is about 12-15 per year. Fungicide treatments represent however more than half of the pesticides applied in viticulture, albeit this crop is planted in low agricultural surface area compared to other crops, and 80% of fungicides is used to protect grapevine plants against powdery and downy mildews (Butault et al. 2010).

Intensive pesticides application has induced negative impacts on the environment and on Human health. Not all the pesticides have side effects, but since more than 10 years some pesticides have been withdrawn from the list of authorized substances. Vine physiology of grapevine could also be affected by chemical products, as reported by Petit et al. (2009). Chemical pesticides could have an influence on microbial communities colonizing grapevine as well, as shown by the changes they induce in the indigenous yeast communities that are necessary for wine making (Milanovic et al. 2013) and wine aroma (González Álvarez et al. 2012). Many pesticide residues have also been identified in the wines (Basa Cesnik et al. 2008). This issue has become therefore a matter of growing concern, resulting in societal

pressure for healthy food, free of pesticides residues, driving research to rapidly develop environmental-friendly and sustainable methods. In this way, there is an increasing trend towards research and development of complementary and/or alternatives methods to chemical control in viticulture. One of the alternative strategies consists in using microorganisms as biocontrol agents (BCAs), which may exert beneficial effects by enhancing the general fitness of the plant and/ or by suppressing plant diseases. Research on BCAs has intensified during the recent decades (Glare et al. 2012). In Europe, fourteen BCAs genera of fungal, oomycete and bacterial microorganisms, such as *Trichoderma* spp., *Pythium oligandrum*, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. are currently registered in European regulation No. 1107/2009 (Gerbore et al. 2014a). BCAs can exert protection by acting (1) directly on phytopathogens and/or (2) indirectly via inducing systemic resistance enabling plant to resist against responsible agents of the diseases (Van wees et al. 2008, Shores et al. 2010, Pieterse et al. 2014). The most described direct form of antagonism is mycoparasitism, where mycoparasite coils around host hyphae and produces cell-wall degrading enzymes and degrade the phytopathogens (Junaid et al. 2013). BCAs can also compete for the niches, spaces and nutriments with the phytopathogens, especially in the rhizosphere, but also on the phyllosphere and other parts of the phytosphere nutrients (Elad and Baker 1985, Loper and Buyer 1991, Hardoim et al. 2015). They can also secrete metabolites enabling reduction of pathogen colonization and infection depending of the strain targeted and the beneficial strain used. Lastly, Induced Systemic resistance (ISR) induced by BCA, and/or their MAMPs and involving primed defense reactions as well as by plant strengthening is well known (Kamilova and Lugtemberg 2009, Compant et al. 2013, Hardoim et al. 2015). We do not want to extend the different mechanisms in this review, but interestingly to discuss the use and parts of the mechanisms of the BCA used to control four major diseases: powdery and downy mildews, trunk diseases, and grey mould. Such diseases are the most worldwide important disease on grapevine.

Finding BCAs for each of such diseases does not require only to reduce infection, but also understand how the disease works before to find a long term solution and to create a portfolio of products. A portfolio of products for each disease is indeed required to avoid resistance of the targeted pathogen towards the BCA.

The use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases has already been described by Compant et al. (2013). In this review, used of fungi and oomycetes as BCA are described regarding their potential to protect grapevine against the four major grapevine diseases caused by pathogenic fungi or oomycete, *i.e.* downy and powdery mildews, grey mould and Grapevine Trunk Diseases (GTD) (Figure 1 and Table 1).

Biocontrol of Downy Mildew

Downy mildew, caused by the obligate biotrophic oomycete, *Plasmopara viticola* (Berk. and Curt.) Berl. and de Toni, is one of the most important and destructive grapevine diseases in temperate climates. This disease affects grape yield and wine quality in many regions, especially in the humid areas of Europe and North America. Losses may reach up to 75% in favourable weather conditions (Gessler et al. 2011). This biotrophic pathogen rapidly invades leaves, causing yellow oily spots on the upper leaf surface and massive sporulations on the underside. In order to control this disease, particularly in the organic vineyards, copper-based fungicides are frequently used, but since 2006 an European Commission regulation has limited the quantities that could be applied on plants. Other phytochemicals are used to control pathogen infections, such as mancozeb, metalaxyl, benomyl and captan. In temperate regions, up to 15 chemical treatments can be applied to control this disease (Wang et al. 2001). However, resistant strains development and concern for possible adverse effects on

environment and Human health have increased the search for alternative strategies such as biological control.

In the last decade, the potential of specific strains to control grapevine downy mildew has been demonstrated by a number of beneficial fungi. Various fungi that can be phytospheric but also endophytic for some strains have been indeed used to control *P. viticola*. A recent study on the antagonistic abilities of *Acremonium* spp. strains isolated from asymptomatic grapevines of cultivar Inzolia in Italy has been for instance performed by Piccolo et al. (2015). Among the 68 strains of *A. persicinum* and 26 of *A. sclerotigenum* they identified, *in vitro* leaf tests showed that all *A. persicinum* strains inhibited sporangia germination of *P. viticola*, with only some of *A. sclerotigenum* having inhibitory effects. Strains belonging to the same species had different degrees of pathogen inhibition (Piccolo et al. 2015), and results show that control of pathogenic agent responsible of *P. viticola* can be done. Strains belonging to *Acremonium* are not the only one that can have effects against the peronosporomycete member. Another fungus, *Fusarium proliferatum* strain G6, has been shown to display mycoparasitic activities against *P. viticola*. Microscopic observations of leaf *in vitro* hyphal interactions showed the antagonist fungus coiled around and inside sporangiophores of *P. viticola* (Falk et al. 1996). This mycoparasitism process reduced by 97% the sporangial production of *P. viticola* on grape leaf disks. Under field conditions, weekly applications of microconidial suspensions of *F. proliferatum* G6 further reduced disease severity on leaves and on fruit clusters. Dependening on the year and grapevine cultivars, protection levels varied from 60 to 71%, on leaves and from 60 to 71%, 53 to 99%. Interestingly, fumonisin mycotoxins usually produced by G6 strain were not detected on the berries treated with the mycoparasite. In order to improve the isolate's performance under various environmental conditions, Bakshi and co-workers (2001) irradiated by UV the *F. proliferatum* G6 isolate in order to create fungal mutations. They obtained a "cold" strain,

coded 1005, able to grow at 13° C which, although it is generally suboptimal for growth of *F. proliferatum*, is suitable for *P. viticola* to survive and reproduce. In a detached-leaf assay carried out at 3°C, it was demonstrated that 1505 strain reduced sporangial production by 85%, whereas treatment with G6 strain reduced their production by only 35%. The exact mechanisms enabling “cold” behavior of strain G6 is not yet known. However, the possibility to handle microbes having effect at low temperature conditions but also at high temperature conditions is needed. Search of microbes from harsh environments could be an alternative solution to control *P. viticola* infection, but not only, also from other sources of environments. Even from the natural environment where grapevine grows, antagonistic microbes could be found on the phyllosphere or from inside the leaves, and also from berries.

As regards to endophytic fungi, *P. viticola* growth can be hampered in its development by some strains of *Alternaria alternata*. Musetti and co-workers (2006) isolated for instance strains of *A. alternata* from leaves of grapevines expressing downy mildew symptoms in Tuscany, Italy. Five out of 126 of these strains completely inhibited *P. viticola* sporulation on grapevine leaf disks. Cytological observation by transmission electron microscopy showed that severe ultrastructural alterations of *P. viticola* hyphae occurred, even without direct contact with *A. alternata*. The changes observed in the pathogen mycelium included enlarged vacuoles, vacuoles containing electron-dense precipitates and necrotic haustoria. Based on these findings, it was hypothesized that *A. alternata* produced molecules with toxic activity against *P. viticola*. With the aim of identifying these molecules, three diketopiperazines (DKP) with low-molecular-weight, *i.e.* cyclo (L-phenylalanine-trans-4-hydroxy-L-proline), cyclo (L-leucine-trans- 4-hydroxy-L-proline) and cyclo (L-alanine-trans-4-hydroxy-L-proline) have been identified. Pre- or post-infection applications of *A. alternata* DPK molecules on *P. viticola* infected leaf disks or in greenhouse grapevine plants inhibited pathogen sporulation. Further tests showed that the DKPs molecules used at different concentrations (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}

and 10^{-6} M) and applied, either alone or in mixtures, 2 or 24 hours after pathogen infection, inhibited *P. viticola* sporulation (Musetti et al. 2007). DKP-treated grapevine leaf tissues did not display any necroses or other phytotoxicity symptoms. We could expect that such mechanisms exist under natural conditions as the strains were isolated from grapevine leaves. Also several strains have been isolated from looking healthier grapevine plants, i.e. with less visual symptoms. Finding the right samples with low disease pressure even on a same vine could lead to find efficient BCAs.

The potential of another endophytic fungus, *Acremonium byssoides*, has been evaluated in this regard by Burruano et al. (2008). During the growing season, when grapevine leaves were infected with *P. viticola*, the endophyte naturally colonized grapevines and hyperparasitized the pathogen by 2 days post-infection. The asexual reproduction form of the pathogen was partly or completely inhibited, as shown by the formation of thin and deformed sporangiophores (Burruano et al. 2008). Moreover, culture filtrates and crude extracts of *A. byssoides* strain A21 completely inhibited the germination of *P. viticola* sporangia. Successive chromatographic fractionation and purification of the crude extracts yielded a family of 6 novel compounds named acremine. These purified new secondary metabolites reduced *P. viticola* germination sporangia by up to 60% (Assante et al. 2005), suggesting that acremines alone were not responsible for the complete inhibiting of the pathogen. Another type of fungus, *Beauveria bassiana*, which is traditionally known for its entomopathogenic abilities, is also able to control plant pathogens, including downy mildew (Ownley et al. 2004, 2008, Vega et al. 2008, Vega et al. 2009, Ownley et al. 2010), showing that not only native population of vines can be efficient to control *P. viticola* disease, by re-application of derived beneficial strain. Jaber (2015) reported indeed recently that four strains of *B. bassiana* colonized grapevine leaf tissues and subsequently reduced significantly downy mildew incidence and severity. Various modes of action were thought to be involved, i.e.

competition for niche or resources (Ownley et al. 2004, 2010) and antibiosis, mycoparasitism or induced systemic resistance (Vega et al. 2009, Ownley et al. 2010). *B. bassiana* strains also produced secondary metabolites, e.g. beauvericin, beauverolides, bassianolides, oosporein, and bassianolone, which have antibacterial, antifungal and insecticidal activities (Ownley et al. 2010).

The use of antagonistic agents has been mainly prospected to control *P. viticola* infection as well as spread. However, the cost for registration can be dependent of metabolite secretion. Another way is to play with BCAs inducing vine resistance, and also their active substances. Regarding the fungus *Penicillium chrysogenum*, an aqueous extract of the dry mycelium has proven to be useful to protect grapevine against *P. viticola* in controlled and field conditions. As no fungicidal effect was observed, induction of plant resistance was assumed. Under certain conditions, *P. chrysogenum* caused phytotoxic side effects, but a partially purified fraction of the fungus, less toxic than the crude extract, provided the same level of grapevine protection against *P. viticola* as the fungal hyphae (Thuerig et al. 2006). Another fungus, *Trichoderma harzianum* strain T39, induced resistance in grapevine against *P. viticola* (Perazzolli et al. 2008, Palmieri et al. 2012). Disease reduction reached 63%, after 3 applications of *T. harzianum* T39 on grapevine leaves (Perazzolli et al. 2008). As *T. harzianum* T39 had no effects on sporangia morphology or germination, this suggests it is a real inducer of grapevine resistance against the pathogenic oomycete. This resistance was systemic and its activation was independent of the leaf position. A few years later, the same group Perazzolli et al (2011) demonstrated that treatments of *T. harzianum* T39 caused a direct modulation of certain plant defense-related genes and the activation of priming after pathogen inoculation. Results also suggested the involvement of jasmonic acid and ethylene signals in the defense processes induced by T39. No negative effects of T39 on grapevine growth, shoot, and root weight, leaf dimension and chlorophyll content were observed.

What is interesting when we see such researches is that products are mainly based on a single microorganism. However, under natural conditions the microbial jungle is present at all the parts of the plants. Interactions microbes-microbes enabling symbiosis and resistance occur naturally. We can expect that some helper bacteria facilitate fungal activity. Further studies should be related to such researches to control *P. viticola* infection. Also the phenotypic plasticity of the BCA should be used to create more aggressive isolates, without transformation, but with more colonization, and also resistance. It is indeed one of the big challenges for us in the next decades, e.g. to play with the microbes we already have and to strengthen their potential at the same time than searching other sources of beneficial microbes. This is not only for *P. viticola* control, but also other vine pathogens.

Biocontrol of Powdery Mildew

Grapevine powdery mildew is for instance another challenge to control worldwide in the vineyards and it is known for a wide. It is caused by the biotrophic ascomycete fungus *Erysiphe necator* (Schwein) Burr., originated from North America and that was introduced into Europe in the middle of the 19th century (Olmo 1986). The pathogen infects all the green tissues of the grapevine, producing a characteristic grey-white layer, made of hyphae producing conidiophores, on the various surfaces of the host tissues it recovers. During the winter, the fungus survives as mycelium in the dormant buds of grapevine, or as fruiting structures known as chasmothecia, and surviving the cold winters (Pearson and Goheen 1988). Control of *E. necator* is currently mainly achieved by frequent applications of sulfur and chemical fungicides. As in the case of downy mildew, health and environmental issues associated with the development of resistance to certain fungicides, *i.e.* dichlofluanide, dithianon, chlorothalonil, etc, and demand for grapes and wines free of fungicides residues

required and still requires the need for alternative methods to substitute for these chemical products. We need indeed to point out that even if a sustainable solution was needed already before, it is still the case.

Accordingly, many experimentations to use biological control agents such as bacteria, fungi, parasitic fungi, oomycete and mycophagous mite (Kiss 2003, Gadoury et al. 2012, Compant et al. 2013) have been carried out. The fungus *Ampelomyces quisqualis* is for instance a naturally occurring mycoparasite of many species of powdery mildew (Kiss 1998), and its ability to reduce severity of grapevine powdery mildew has been reported by many authors in the literature (Falk et al. 1995a,b, Kiss 2003, Angeli et al. 2008, Sucharzewska et al. 2012). This mycoparasite colonizes hyphae, conidiophores, conidia and cleistothecia of the pathogen as well (Sutton 1980). *A. quisqualis* strains parasitize *E. necator* cleistothecia overwintering on the bark, which is considered as the main source of inoculum for primary powdery mildew infections in the vineyard (Falk et al. 1995b, Angeli et al. 2006, Angeli et al. 2008). A two-year experiment in fields showed that when *A. quisqualis* colonized cotton wicks deployed in vineyards, disease severity, but not incidence, was reduced (Falk et al. 1995a). A major limitation in the use of *A. quisqualis* to control *E. necator* is, however, the requirement of free water for the mycoparasite to achieve its infection process. One strain of *A. quisqualis* was used in 2005, *i.e.* within the biofungicide commercial product AQ10, to control powdery mildew. It is recommended to apply AQ10 only after rainfall because of the need of water for *A. quisqualis* growth, and to avoid the inhibiting effect of certain fungicides on the mycoparasite (Schweigkofler 2006). In line with these previous comments, Angeli et al. (2006) reported that the mature stage of cleistothecia at the time of AQ10 application and climatic conditions strongly influence the efficacy of *A. quisqualis* in the vineyards.

Another fungus, a yeast named *Pseudozyma flocculosa*, is an efficient natural antagonist of powdery mildew (Bélanger and Labbe 2002). In Greece, a formulation of *P.*

flocculosa, named Sporodex[®] L, was tested under controlled conditions and in the fields (Konstantinidou-Doltsinis et al. 2007). This biofungicide displayed some limitations when the pathogenic pressure was high. In this case, it was recommended to apply Sporodex[®] L at the same time as the pathogen development. The efficacy of other yeasts, *Tilletiopsis pallescens*, *T. minor* and *T. washingtonensis*, against powdery mildew was also investigated on grapes, *in vitro* and *in vivo* (Haggag et al. 2007). The percentage of spore germination and infected area per leaf disk decreased after treatment with spore suspension or culture filtrate of *Tilletiopsis* spp. The application of a mixture of the three yeasts enhanced the protection level obtained as opposed to single applications. These authors also showed that strains of *Tilletiopsis* spp. produced high levels of protease, exochitinase, exocluvanase and β -1,3-glucanase in broth culture, and that the amounts of inhibition were directly correlated to the level of these enzyme concentrations. This suggested that *Tilletiopsis* spp. enzymes have a major role in controlling *E. necator*. In field trials, the treatment reduced the development of powdery mildew on leaves and flowers in 3 cultivars, *i.e.* King's Ruby, Superior and Thompson Seedless. As in *in vitro* bioassays, treatment using a mixture of *Tilletiopsis* spp. was more effective than with one species. Finally, these yeasts were as effective as fungicide in controlling grapevine powdery mildew. Another fungus, *Verticillium lecanii*, is a hyperparasite of grapevine powdery mildew (Heintz and Blaich 1990) able to penetrate pathogen spores either directly or by means of appressoria, resulting in the infected spores shrinking and dying.

Grapevine powdery mildew control could also be done by induction of plant resistance, as in the case of downy mildew. Thuerig and co-workers (2006), suggested that an aqueous extract of the dry mycelium of *P. chrysogenum* protected grapevine from *E. necator* infections under greenhouse and field conditions. A recent study by Gerbore et al. (2014b) demonstrated that grapevine leaf treatments with *Pythium oligandrum* filtrate, or an elicitor

molecule produced by this oomycete named oligandrin, reduced *E. necator* development. The pathogen leaf coverage and sporulation were reduced by 48% and 44%, respectively in comparison with the control. However, depending on *P. oligandrum* strains used, significant differences were obtained.

Biocontrol of Grey mould

Botrytis cinerea (Pers.: Fr) causes one of the major fruit rot diseases of grapes and it is also a major challenge to control. It is harmful, particularly during the pre-harvest period in vineyards with temperate climates. *B. cinerea* infects leaves, stems, flowers and fruits, causing grey mould and bunch rot. It is responsible of substantial economic losses in wine and table grapes through grape desiccation, rot and biochemical changes that reduce wine quality (Mullins et al. 1992). During the past few decades, many studies have reported effective pre-harvest disease control by commercially available biological control agents and other microorganisms (Elmer and Reglinski 2006, Nally et al. 2012). Numerous beneficial bacteria belonging to *Pseudomonadaceae*, *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Actinobacteria* and *Burkholderiaceae* have been shown to be effective in controlling grey mould (Compant et al. 2011, 2013). Additionally, the ability of certain fungi such as *Trichoderma* spp. and many yeasts to control *B. cinerea* attacks have also been reported (Harman et al. 1996, Zimand et al. 1996, Elad 2000, Utkhede and Mathur 2002, Elmer and Reglinski 2006, Jacometti et al. 2010).

As regards the *Trichoderma* genus, many experiments have shown that *T. harzianum* is useful to control *B. cinerea*. Reports indicated that, (i) *T. harzianum* could replace some field applications of chemical products, such as iprodione or vinclozolin, with little reduction in efficacy, (ii) conidia of *T. harzianum* strain P1 and from another strain T39 (registered as a

biofungicide named Trichodex) were effective to control diseases caused by *B. cinerea* (Latorre et al. 1997, Zimand 1996, Sesan et al. 1999, Elad 2000, Rajkovic et al. 2013). Many mechanisms have been suggested as being responsible for *B. cinerea* direct control by *T. harzanium*: competition for space and nutrients (Dubos and Bulit 1981), mycoparasitism (Bélanger et al. 1995, Vidhyasekaran 2004), antibiotic production (Vidhyasekaran 2004) and induction of plant defenses (De Meyer 1998). A bioproduct, Trichopulvin 25 PU, based on another *Trichoderma* species, *T. viride*, was combined with chemical products, significantly reducing grey mould attacks in seven vineyards. Fungi belonging to *Ulocladium* genus have been also frequently used to control *Botrytis* bunch rot (Lennartz et al. 1998, Roudet and Dubos 2001, Elmer et al. 2003, Elmer and Reglinski 2006, Jacometti 2010). For instance, Reglinski et al. (2005) showed that, in field or *in vivo* (on bunches in high humidity chambers), applications of *Ulocladium oudemansii* reduced significantly *Botrytis* rot at harvest on grapes of cultivar Chardonnay. Higher efficacy was obtained when *U. oudemansii* was combined with a chemical elicitor, 5-chlorosalicylic acid (5CSA). Another fungus, *Acremonium cephalosporium* strain B11, applied on detached berries, reduced *B. cinerea* incidence by 16 % and 48 % (Zahavi et al. 2000).

Oomycetes from the *Pythium* genus, *i.e.* *Pythium periplocum* and *Pythium radiosum*, were aggressive mycoparasites of *B. cinerea* (Paul 1999a,b). They entered and severely damaged the mycelium of the pathogen. When this mycoparasited mycelium of *B. cinerea* was applied to grapevine leaves, characteristic grey mould symptoms failed to appear (Paul 1999a,b).

Many yeasts and yeast-like fungi, *e.g.* *Aureobasidium pullulans*, *Candida* spp., *Metschnikowia* spp., *Pichia membranifaciens*, *Sacharomyces* spp., which are major components of the epiphytic microbial community on the surfaces of fruits and vegetables, could be also used to control *B. cinerea*. They have been further tested to control *B. cinerea*.

Spatial and nutrient competition on the fruit surface were considered to be the main mechanisms by which they reduce *B. cinerea* attacks (Lima et al. 1997, Filnow 1998, Santos and Marquina 2004, Droby et al. 2009, Sharma et al. 2009, Raspor et al. 2010, Jijakli 2011). 225 yeasts isolated from must and grape berries were also screened *in vitro* (Nally et al. 2012) and 16 of them, *i.e.* 15 *Saccharomyces cerevisiae* and 1 *Schizosaccharomyces pombe*, displayed antagonistic properties against *B. cinerea* at 25 °C. Lima et al. (1998) showed that grape berry treatments with *Cryptococcus laurentii* LS-11 and *Rhodotorula glutinis* LS-28 could reduce also significantly *Botrytis* bunch rot. Isolate LS-28 exhibited however a higher and more stable activity than LS-11.

Several researches have focused since around 10 years on the control of *B. cinerea* on grapevine. A lot of examples exist. We can still further say that decay incidence caused by *B. cinerea* on wounded detached berries was reduced to 8 and 16 % by *Candida guilliermondii* A42 and *Acremonium cephalosporium* B11, respectively. Better results were obtained on small clusters with intact berries, and the protection levels increased and reached 30 and 48 % after application of strains A42 and B11, respectively (Zahavi et al. 2000). The ubiquitous yeast-like fungus, *Aureobasidium pullulans* strain LS-30, displayed also significant antagonistic activity against *B. cinerea* in table grapes via competition for nutrients (Lima et al. 1996, Castoria et al. 2001) and production of extracellular β -1,3 glucanase and nagase activities both *in vitro* and *in vivo* (Castoria et al. 2001). *P. membranifaciens* strain FY-101, isolated from grape skin, secreted also β -1,3 glucanase *in vitro*. It could be one of the possible mechanisms related to this antagonistic effect against *B. cinerea*. (Masih et al. 2001). Various species of the genus *Metschnikowia* have been furthermore evaluated as potential BCAs. Strains 320 of *M. pulcherrima* and Y-27328 of *M. fructicola* were identified as effective antagonist microorganisms to control *Botrytis* storage rot in table grapes (Nigro et al. 1999, Kurtzman and Droby 2001).

In vineyards, during 3 seasons, the registered yeast product Saccharopulvin 25 PU, based on *Saccharomyces chevalieri*, was applied 3 weeks before harvest at different stages of grapevine growth, *i.e.* end of flowering, petal fall, berry formation and bunch closure. Saccharopulvin treatment efficacy was about 91% on average over the 3-year period. *C. guillermondii* A42 and *A. cephalosporium* B11 were also tested in field-grown table and wine grapes. Two to five applications of A42, at 7 to 10 day intervals, to both crops reduced the incidence of *B. cinerea* rot. However, B11 only reduced rot inducing pathogen on the wine grapes.

The antagonistic yeast *Candida sake* CPA-1, applied in combination with the fatty acid-based additive Fungicover[®], significantly also reduced *Botrytis* bunch rot incidence and severity at harvest in field experiments in dry Mediterranean climate conditions (Cañamàs et al. 2011, Calvo-Garrio et al. 2013a, b). Applications of *C. sake*, and the fungicide Fungicover, between flowering and harvest, significantly reduced botrytis bunch rot incidence and severity by 64% and 90%, respectively, in 2009, and by 67% and 89%, respectively, in 2010.

Certain studies moreover showed that some fungi and an oomycete reduced *B. cinerea* incidence on grapevine leaves, by inducing plant defenses. After grapevine treatments with the oomycete, *P. oligandrum*, or one of its elicitor, oligandrin, reduction of 75% of leaf invasions by *B. cinerea* was obtained (Mohamed et al. 2007). In the leaves of those grapevines, LTP-1 gene expression was enhanced in response to oligandrin application, and RNA transcript levels of β -1,3-glucanase and stilbene synthase increased in response to all treatments with different magnitudes. According to Lennarte et al. (1998), Roudet and Dubos (2001), and Metz et al. (2002), the saprophytic fungus *Ulocladium atrum* displayed also some potential to control grapevine grey mould. Ronseaux et al. (2013) reported that, under controlled conditions, foliar application of a strain of *U. atrum* reduced *B. cinerea* attacks and induced plant defenses by increasing the chitinase activity. Pre-inoculation of *U. atrum* 4 days

before the pathogen infection led to a reduction of the pathogen spore production by more than 90%. In addition, *U. atrum* was able to promote grapevine plantlet growth.

B. cinerea reduction can be easily done because of the amount of information we have on such fungus, and the easy way it can induce disease. However, there are also difficult diseases in grapevine that have re-emerged in a decade.

Biocontrol of Grapevine Trunk Diseases (GTDs)

GTDs are diseases that affect the wood organs of grapevines, *i.e.* trunks, cordons and rootstocks and are re-emerging disease for most of them, and they are not so easy pathosystems, compared to *B. cinerea*, mainly due to long exposition of the pathogens before to have symptomatic plants. The three main GTD are Esca, *Eutypa dieback*, *Botryosphaeria dieback*. It is currently estimated that around 13% of French vineyards is unproductive due to trunk diseases, mainly because of Esca (Grossman and Doublet 2012, Bruez et al. 2013), and losses were estimated at around 1 billion euros in France in 2014. These diseases cause serious economic losses in the wine industry worldwide but, since the ban of sodium arsenate in many grape-producing countries, in 2001 in France, no effective chemical fungicides have been registered to control GTDs. In this context, research on BCAs is on the increase and several microorganisms are currently tested. The three main GTDs are briefly described and the fungi or oomycetes used in order to control them.

Esca

The etiology of Esca is thought to result from the pathological action of several fungi that lead to dieback and grapevine death. Some fungi are typically associated with the various types of internal wood necrosis, *i.e.* *Phaeoconiella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M. J. Wingf. & Mugnai) Crous & W. Gams, *Phaeoacremonium aleophilum* W. Gams, Crous, M.J.

Wingf. & Mugnai and *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch. These fungi invade the wood tissues of perennial organs and, to a lesser extent, the annual canes (Mugnai et al. 1996, Larignon and Dubos 1997). *P. chlamydospora* and *P. aleophilum* induce different types of necroses: central necrosis, black punctuate necrosis and sectorial necrosis, while white rot, which is the last step of wood degradation, is caused by *F. mediterranea*. Two main forms of Esca have been described: (i) the chronic form, with typical tiger-stripe pattern discolorations of the leaves and (ii) an apoplectic form, leading to the sudden wilting and death of the grapevines in a few days. Foliar symptoms of Esca are the result of internal degradation of wood tissues by the different fungi mentioned above (Rumbos and Rumbou 2001, Gimenez-Jaime et al. 2006, Larignon et al. 2009, Maher et al. 2012, Bertsch et al. 2013). No fungal pathogens have been isolated from Esca leaf lesions (Viala 1926). *In vivo*, pathogenicity tests showed that *P. chlamydospora* and *P. aleophilum*, produce internal wood necrosis on rooted cuttings or rootstocks (Eskalen et al. 2001, Sparapano et al. 2001, Gubler et al. 2004, Laveau et al. 2009). Given the absence of chemical treatments against GTDs, some biological assays using fungi naturally present in the environment have been investigated in nurseries and in vineyards.

Most grapevine trunk pathogens penetrate in grapevines through pruning wounds. The time of application of BCA on pruning wounds is a key point, because they remain susceptible to infection for at least 4 weeks (Eskalen et al. 2007) and up to 4 months (Serra et al. 2008). Many formulations based on *Trichoderma* spp. strains such as Esquive WP®, Remedier®, Trichoflow-T, Trichodex, were assessed to protect grapevines against Esca. In France, Esquive® WP, a biofungicide, based on *T. atroviride* I-1237 strain has been recently registered to control this disease. According to Mounier et al. (2014), applying Esquive® WP during two years on pruning wounds of mature grapevines in the vineyards, reduced the expression of foliar symptoms of Esca by 50%, and the rate of plant mortality decreased.

Kotze et al. (2011) evaluated the potential of 3 *Trichoderma* products: Biotricho® (*T. harzianum* biotricho), Vinevax (3 *T. harzianum* strains and 3 *T. atroviride* strains) and Eco77® (*T. harzianum* eco77 strain) and two *Trichoderma* spp. (USPP-T1 and USPP-T2) to control fungi involved in GTDs. *In vitro* assays showed that all the *Trichoderma* strains were able to grow on *P. chlamydospora*. In the field, the better protection, *i.e.* reduction by 77% of *P. chlamydospora* incidence, was obtained after treatment of fresh pruning wounds with *Trichoderma* sp. USPP-T1. These authors reported that because of their origin, *T. atroviride* strains have been isolated from grapevine pruning wounds, they were particularly effective at reducing infection on pruning wounds. They were probably more adapted to the grapevine wood environment (Kotze et al. 2011). In South African nurseries, certain studies showed that soaking the planting material in *Trichoderma* formulation reduced the incidence of *P. chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. in rootstock cuttings (Fourie and Halleen 2004, 2006). Other studies showed that vascular streaking induced by *P. chlamydospora* was significantly reduced in *T. harzianum*-inoculated shoots (Di Marco et al. 2004, Di Marco and Osti 2007). In Italy, field trials performed over a 5-year period pointed out that Esca symptomatic vines and foliar symptom severity of susceptible grapevine cultivars such as Cabernet Sauvignon, Sauvignon and Sangiovese, were reduced after spring pruning wound treatment with Remedier®. This product is an organic fungicide containing 2 selected strains of *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma gamsii*, whose activity was mainly related to the reduction in the spread of new infections. Application of *Trichoderma* isolates could protect pruning wounds from infection from artificial *P. chlamydospora* inoculations (Aloi et al. 2015). Control using *Trichoderma* looks promising. However, combining different kinds of microbes for efficient pathogen reduction is now necessary. We know that control in the field is still problematic even if the products exist. Increasing the potential of each strain could be done to maximize wood protection.

Protecting grapevine against Esca by inducing plant defenses has not been well investigated and should be also further carried out. This process of plant protection has been demonstrated using *Pythium oligandrum* strains to control *P. chlamydospora* infections on young vines. Three greenhouse assays pointed out that the application of this oomycete, at the root level of Cabernet Sauvignon cuttings, reduced *P. chlamydospora* necroses by 40% to 50%. Root colonization of the oomycete was associated with enhanced plant defense responses to the pathogen infection at the trunk level. Six genes involved in various plant defense pathways, *i.e.* PR proteins, phenylpropanoid pathways, oxylipin and oxydo-reduction systems, were more significantly induced in plant inoculated by the two microorganisms than in those inoculated only by *P. chlamydospora* (Yacoub et al. 2016).

Botryosphaeria dieback

Botryosphaeria dieback is caused by several *Botryosphaeriaceae* species, the most common species being *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) ces. & De Not., *Diplodia seriata* De Not., *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, or *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl (Úrbez-Torres 2011). *Botryosphaeria dieback* is another trunk disease for which need for solution is required. These fungi are very cosmopolitan and polyphagous. They are isolated from different plants and can cause a large amount of decay (Slippers et al. 2007). They could exhibit different pathogenicity levels, and *N. parvum* is considered to be the most virulent species, regarding the size of necrosis that it causes (Martos et al. 2008, Pitt et al. 2013, Chen et al. 2014). Wood symptoms of the disease consist of sectoral and longitudinal brown wood streaking, and perennial cankers. To control these fungi, as in the case of Esca, there are no effective chemical methods. Few studies have shown the ability of certain microorganisms to reduce attacks caused by the *Botryosphaeraceae* species. Some bacteria such as *Bacillus subtilis*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter* sp. reduced necroses

caused by *N. parvum* or *L. theobromae* (Kotze et al. 2011, Haidar et al. 2016) Regarding fungi, *T. atroviride* strain I237, showed interesting potential because, in young plants treated with it, necroses produced by *D. seriata* and the quantity of the pathogen were reduced (Mounier et al. 2014). Recently, Kovacs et al. (2014) showed the ability of 11 *Trichoderma* strains, isolated from asymptomatic plants, to overgrow *D. seriata* mycelium, for which the biocontrol index was established at 100% for all *Trichoderma* strains. Macroscopic and microscopic observations carried out by Kotze et al. (2011) showed the interesting potentiality of *Trichoderma* strains to parasitize three Botryosphaeria species, i.e. *N. australe*, *N. parvum* and *D. seriata*, through overgrowth, hyphal disintegration of the pathogen, formation of an inhibitory zone. In this same study, pruning wound treatment with spore suspensions of *T. atroviride* strain UPSS-T1 reduced the incidence of *N. australe*, *N. parvum* and *D. seriata* by 80, 85 and 92%, respectively.

Several other BCA as fungi or oomycetes should be tested to control Botryosphaeria dieback. The current amount of information regarding the ecology and infection caused by *Botryosphaeriaceae* members should lead to better understand how a BCA against the disease should act. However, even if a solution could be proposed in the future to reduce the risk of infection or of colonization, trunk diseases are diverser, and exploiting a microbe to reduce infection could cause more infection by another pathogen. The complexity of the vine pathobiome should be taken into account. Not only one disease should be indeed taken into account, but several to maximize the use of BCAs.

Eutypa dieback

The other trunk disease, *Eutypa dieback*, is mainly caused by the diatrypaceous fungus named *Eutypa lata* (Pers.) Tul. & C. Tul. This disease is present in most of the vineyards in the world, and leads to substantial economic losses. Other fungi of this family, such as

Cryptovalsa ampelina (Incertae sedis) (Nitschke) Fuckel, *Diatrype stigma* (Hoffm.) Fr. and *Eutypa leptoplaca* (Mont.) Rappaz, were also observed in Eutypa dieback affected plants (Gubler et al. 2005, Trouillas et al. 2010). Stunted growth of the vegetation, development of small leaves and sectorial necroses in the wood are characteristic symptoms of this disease (Gubler et al. 2005, Almeida 2007). Frequently, Eutypa dieback ends up in plant death in 3 to 5 years after the visualization of the first symptoms (Almeida 2007). As in the case of Esca and Botryosphaeria dieback, various *Trichoderma* strains have been assessed as potential biocontrol agents to control Eutypa dieback (John et al. 2005, Halleen et al. 2010, Kotze et al. 2011). As mentioned above, in France, the first and only product approved against GTDs, including Eutypa dieback, is Esquive®. In a study carried out by Kotze et al. (2011), it was observed that numerous *Trichoderma* strains grew over *E. lata*, but noted that, depending on the interactions, hyphae of the pathogen were coiled by those of *T. atrovide* Ag5, *T. harzanium* eco 77 and *Trichoderma* sp. whereas *T. harzanium* Ag11 and Bitricho disintegrated the pathogen hyphae. In field experiments, the best results were obtained with *Trichoderma* sp. USPP-T1, which reduced *E. lata* incidence by 76% (John et al. 2005, Hallen et al. 2010, Kotze et al. 2011). However, Hallen et al. 2010 showed that protection of pruning wood using chemical products (benomyl and flusilazole) was more effective than *Trichoderma* treatments. *Fusarium lateritium* was also used to control Eutypa dieback (Munkvold and Marois 1993, John et al. 2005). When *E. lata* infection of pruning wood was delayed by 14 days after *F. lateritium* application, reducing of infection was about 71% (Munkvold and Maroi 1993).

This gives examples of BCAs currently used to counteract pathogen infection inside the trunk. This is also the case for grey mould, powdery and downy mildews. However, there are several things that we need to take into account if we want to reduce more the different infection in the field.

Future prospects

The first point is to understand, for future prospects, better some pathosystems. We are still at a time where we do not understand well the black boxes of some diseases. Plant pathologists are needed, but also microbiologists and geneticists. How solution can be proposed if the pathosystems are not well understood? Also, we need to take into account that the microbes leading to pathogenicity are never in some niches alone, and that parts of the vine microflora may help, or reduce their pathogenicity. Such microbes can be singly isolated and further apply to control the disease. Also, are we sure that the microbe leading to pathogenicity does the pathogenicity alone? Interaction with other kind of microbes should be studied. Another point is to find better BCAs than the traditional ones currently used. The worldwide ecosystem can lead to find special candidates enabling vine protection to specific vine disease. Nagoya protocol allows using microbes from other environments and depending of the countries where they have been isolated. We can also found specific BCAs from specific environment in the same region. We often look in fact at the vine ecosystem, without looking nearby to find suitable microbes. However, epiphytic as well as endophytic microbes from other plants could lead to select new BCA, and new BCA are required to control the major grapevine diseases.

Another point for future prospects is that resistance of fungal and oomycete BCA towards copper, and sulfate is always missing at the first step of selection of a BCA, and when it has effect under greenhouse conditions, it could not work in the field. Screening for resistance should be done first due to the amount of copper and sulfate put in the field.

High throughput screening of thousands of microbes should be also done. Developing the technologies to screen fungi, oomycetes or their metabolites against major grapevine phytopathogens can increase our portfolio of beneficial products. Genome mining of BCA should be also done to rapidly find suitable candidates as BCAs. The time is still running,

farmers had diseases, lose their quality, but are asked to make sustainable agriculture. We need to find new solution, or think differently to find better suitable BCAs. We need also to think about the consequences to use some microbes as BCAs, to not have the same problem than with chemical pesticides later on, e.g. to withdraw then their application. This could be done by genomic analyzes of the strains used as BCAs as well as with behavior monitoring. A considerable amount of researches is therefore still required to control grapevine major diseases. Future research will lead to new BCA and to new products. We will not eradicate each of the diseases, but reduce it to a respectable level, and this would be great, before that a new one might emerge from the vines.

Acknowledgements

We deeply thank the Poupelain foundation and, the French Ministry of Agriculture (V1302 through the Casdar research project on Grapevine Trunk Diseases) for their financial support.

References

- Aloi, F., Reggiori, G., Bigot, A., Montermini, P., Bortolotti, R., Nannini, F., Osti, L., Mugnai L. and Di Marco S. REMEDIER® (*Trichoderma asperellum* and *Trichoderma gamsii*): a new opportunity to control the esca disease complex. Five years of results of field trials in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* **54**, 2, 420–436.
- Angeli, D., Di Marino, E. and Mescalchin, E. (2006) Colonization of grapevine powdery mildew cleistothecia by the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis* in Trentino-Alto Adige, Italy. *IOBC/WPRS Bulletin* **29**, 89–92.
- Almeida, F. (2007) Technical note 2 - grapevine wood diseases-eutypa dieback and esca. *ADVID Technical Notes* 1–14.
- Assante, G., Dallavalle, S., Malpezzi, L., Nasini, G., Burruano, S. and Torta, L. (2005) Acremines A-F, novel secondary metabolites produced by a strain of an endophytic Acremonium, isolated from sporangiophores of *Plasmopara viticola* in grapevine leaves. *Tetrahedron* **61**, 7686–7692.
- Bakshi, S., Szejnberg, A. and Yarden, O. (2001) Isolation and characterization of a cold-tolerant strain of *Fusarium proliferatum*, a biocontrol agent of grape downy mildew. *Phytopathology* **91**, 1062–1068.
- Baša-Česnik, H., Gregorčič, A. and Čuš, F. (2008) Pesticide residues in grapes from vineyards included in integrated pest management in Slovenia. *Food Additives and Contaminants* **25**, 438–443.
- Bèlanger, R.R., Dufour, N., Caron, J. and Benhamou, N. (1995) Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. *Biocontrol Science and Technology* **5**, 41–53.
- Bèlanger, R.R. and Labbè, C. (2002) Bèlanger RR, Bushnell WR, Dik AJ, Carver TLW, eds. The powdery mildews. Control of powdery mildews without chemicals: prophylactic and biological alternatives for horticultural crops. (The American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota) pp. 256–267.
- Bertsch, C., Ramirez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E., Spagnolo, A., Clément, C. and Fontaine, F. (2013) Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology* **62**, 243–265.

- Bruez, E., Lecomte, P., Grosman, J., Doublet, B., Bertsch, C., Fontaine, F., Ugaglia, A., Teisseidre, P.L., Guerin-Dubrana, L. and Rey, P. (2013) Overview of the grapevine trunk diseases in France in the early 2000s. *Phytopathol Mediterr* **52**, 262–275.
- Burruano, S., Alfonzo, A., Piccolo, S.I., Conigliaro, G., Mondello, V., Torta, L., Moretti, M. and Assante, G. (2008) Interaction between *Acremonium byssoides* and *Plasmopara viticola* in *Vitis vinifera*. *Phytopathologia Mediterranea* **47**, 122–131.
- Butault, J.P., Dedryver, C.A., Gary, C., Guichard, L., Jacquet, F., Meynard, J.M., Nicot, P., Pitrat, M., Reau, R., Sauphanor, B., Savini, I. and Volay, T. (2010) *Ecophyto R&D. Quelles voies pour réduire l'usage des pesticides ? Synthèse du rapport d'étude*, INRA Editeur (France), p.90.
- Calvo-Garrido, C., Elmer, P.A.G., Viñas, I., Usall, J., Bartra, E. and Teixidó, N. (2013a) Biological control of botrytis bunch rot in organic wine grapes with the yeast antagonist *Candida sake* CPA-1. *Plant Pathology* **62**, 510–519.
- Calvo-Garrido, C., Viñas, I., Elmer, P.A., Usall, J. and Teixidó, N. (2013b) Suppression of *Botrytis cinerea* on necrotic grapevine tissues by early-season applications of natural products and biological control agents. *Pest Management Science* **70**, 595–602.
- Cañamas, T.P., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Solsona, C. and Teixidó, N. (2011) Field applications of improved formulations of *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* in grapes. *Biological control* **56**, 150–158.
- Castoria, R., De Curtis, F., Limi, G., Caputo, L., Pacifico, S. and De Cicco, V. (2001) *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Postharvest Biology and Technology* **22**, 7–17.
- Chen, S., Morgan, D.P., Hasey, J.K., Anderson, K. and Michailides, T.J. (2014) Phylogeny, morphology, distribution and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthaceae* from English Walnut in California. *Plant disease* **98**, 636–652.
- Compant, S., Mathieu, F. and Lebrihi, A. (2011) Biocontrol de *Botrytis cinerea* par des bactéries bénéfiques de la rhizosphère ou de l'endosphère. *Revue d'œnologie* **141**, 15–16.
- Compant, S., Brader, G., Muzammil, S., Sessitsch, A., Lebrihi, A., and Mathieu, F. (2013) Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. *BioControl* **58**, 435–455.
- Di Marco, S., Osti, F. and Cesari, A. (2004) Experiments on the control of esca by *Trichoderma*. *Phytopathologia Mediterranea* **43**, 108–115.
- Di Marco, S. and Osti, F. (2007) Applications of *Trichoderma* to prevent *Phaeomonniella chlamydospora* infections in organic nurseries. *Phytopathologia Mediterranea* **46**, 73–83.

- De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y. and Höfte, M. (1998). Induced systemic resistance in *Trichoderma Harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **104**, 279–286.
- Droby, S., Wisniewski, M.E., Macarasin, D. and Wilson, C. (2009) Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology* **52**, 137–145.
- Dubos, B. and Bulit, J. (1981) Ill.:BlackmanJ.P, eds. Filamentous fungi as biocontrol agents on aerial plant surfaces *Microbial Ecology of the phyl/oplalle*. (Academic Press, London) pp. 353–356.
- Elad, Y. and Baker, R. (1985) Influence of trace amounts of cations and siderophore - producing pseudomonads on chlamydospore germination of *fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **75**, 1047–1052.
- Elad, Y. (2000) *Trichodema harzianum* T39 preparation for biocontrol of plant diseases – control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. *Biocontrol Science and Technology* **10**, 499–507.
- Elmer, P.A.G., Reglinski, T., Wood, P.N., Hill, R.A., Marsden, S.M., Parry, F. and Taylor, J.T. (2003) Suppression of *Botrytis* in grapes using a combination of elicitors and fungal antagonists. *Proceedings of the 8th International Congress of Plant Pathology*, Christchurch, New Zealand, abstract 43.
- Elmer, P.A.G. and Reglinski, T. (2006) Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology* **55**, 155–177.
- Eskalen, A. and Gubler, W.D. (2001) Association of spores of *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium inflatipes*, and *Pm. aleophilum* with grapevine cordons in California. *Phytopathologia Mediterranea* **40**, 429–432.
- Eskalen, A., Feliciano, A.J. and Gubler, W.D. (2007) Susceptibility of grapevine pruning wounds and symptom development in response to infection by *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora*. *Plant Disease* **91**, 1100–1104.
- Falk, S.P., Gadoury, D.M., Cortesi, P., Pearson, R.C. and Seem, R.C. (1995a). Parasitism of *Uncinula necator* ascomata by the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis*. *Phytopathology* **85**, 794–800.
- Falk, S.P., Gadoury, D.M., Pearson, R.C. and Seem, R.C. (1995b). Partial control of grape powdery mildew by the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis*. *Plant Disease* **79**, 483–490.

- Falk, S.P., Pearson, R.C., Gadoury, D.M., Seem, R.C. and Szejnberg, A. (1996) *Fusarium proliferatum* as a biocontrol agent against grape downy mildew. *Phytopathology* **86**, 1010–1017.
- Filnow, A.B. (1998) Role of competition for sugars by yeasts in the biological of gray mold and blue mold of apple. *Biocontrol Science and Technology* **8**, 243–256.
- Fourie, P.H. and Halleen, F. (2004) Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material. *Plant Disease* **88**, 1241–1245.
- Fourie, P.H. and Halleen, F. (2006) Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. *European Journal of Plant Pathology* **116**, 255–265.
- Gadoury, D.M., Cadle-Davidson, L., Wilcox, W.F., Dry, I.B., Seem, R.C. and Milgroom, M.G. (2012) Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. *Molecular Plant Pathology* **13**, 1–16.
- Gerbore, J., Benhamou, N., Vallance, J., Le Floch, G., Grizard, D., Regnault-Roger, C. and Rey, P. (2014a) Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environmental science and pollution research international* **21**, 4847–4860.
- Gerbore, J., Vallance, J., Yacoub, A., Delmotte, F., Grizard, D., Regnault-Roger, C. and Rey, P. (2014b) Characterization of *Pythium oligandrum* populations that colonise the rhizosphere of vines from the Bordeaux region. *FEMS microbiology ecology* **90**, 153–167.
- Gessler, C., Pertot, I. and Perazzolli, M. (2011) *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea* **50**, 3–44.
- Gimenez-Jaime, A., Aroca, A., Raposo, R., Garcia-Jimenez, J. and Armengol, J. (2006) Occurrence of fungal pathogens associated with grapevine nurseries and the decline of young vines in Spain. *Journal of Phytopathology* **154**, 598–602.
- Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., Marrone, P., Morin, L. and Stewart, A. (2012) Have biopesticides come of age? *Trends Biotechnol* **30**, 250–258.
- González Álvarez, M., Noguerol-Pato, R., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B. and Simal-Gándara, J. (2012) Changes of the sensorial attributes of white wines with the

- application of new anti-mildew fungicides under critical agricultural practices. *Food Chemistry* **130**, 139–146.
- Grosman, J. and Doublet, B. (2012) Maladies du bois de la vigne. Synthèse des dispositifs d'observation au vignoble, de l'observatoire 2003–2008 au réseau d'épidémiologie de surveillance actuel. *Phytoma* **651**, 31–35.
- Gubler, W.D., Thind, T.S., Feliciano, A.J. and Eskalen, A. (2004) Pathogenicity of *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora* on grape berries in California. *Phytopathologia Mediterranea* **43**, 70–74.
- Gubler, W.D., Rolshausen, P.E., Troillase, F.P., Urbez, J.R. and Voegel, T. (2005) Grapevine trunk diseases in California. *Practical Winery & Vineyard: Grapegrowing* January/February, 1–9.
- Haggag, M.W., Saker, M.M. and Ibrahim, A.M. (2007) Biocontrol activity and molecular characterization of three *Tilletiopsis* spp. against grape powdery mildew. *Plant Protection Bulletin (Taipei)* **49**, 39–56.
- Haidar, R., Deschamps, A., Roudet, J., Calvo-Garrido, C., Bruez, E., Rey, P. and Fermaud, M. (2016) Multi-organ screening of efficient bacterial control agents against two major pathogens of grapevine. *Biological Control* **92**, 55–65.
- Halleen, F., Fourie, P.H. and Lombard, P.J. (2010) Protection of grapevine pruning wounds against *Eutypa lata* by biological and chemical methods. *South African Journal of Enology and Viticulture* **31**, 125–132.
- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., Berg, G., Pirttilä, A.M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M. and Sessitsch, A. (2015) The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **79**, 293–320.
- Harman, G.E., Latorre, B.A., Agosin, E., San Martín, R., Riegel, D.G., Nielsen, P.A., Tronsmo, A. and Pearson, R.C. (1996) Biological and integrated control of Botrytis bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. *Biological control* **7**, 259–266.
- Heintz, C. and Blaich, R. (1990) *Verticillium lecanii* as a hyperparasite of grapevine powdery mildew (*Uncinula necator*). *Vitis* **29**, 229–232.
- Jaber, L.R. (2015). Grapevine leaf tissue colonization by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* s.l. and its effect against downy mildew. *BioControl* **60**, 103–112.
- Jacometti, M.A., Wratten, S.D. and Walter, M. (2010) Review: alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards. *Australian Journal of Grape And Wine Research* **16**, 154–172.

- Jijakli, M.H. (2011) *Pichia anomala* in biocontrol for apples: 20 years of fundamental research and practical applications. *Journal of General and Molecular Microbiology* **99**, 93–105.
- John, S., Wicks, T.J., Hunt, J.S., Lorimer, M.F., Oakey, H. and Scott, E.S. (2005) Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata* using *Trichoderma harzianum* and *Fusarium lateritium*. *Australasian Plant Pathology* **34**, 569–575.
- Junaid, J.M., Dar, N.A., Bhat, T.A., Bhat, A.H. and Bhat, M.A. (2013) Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens. *International Journal of Modern Plant & Animal Sciences* **1**, 39–57.
- Kiss, L. (1998) Natural occurrence of *Ampelomyces* intracellular mycoparasites in mycelia of powdery mildew fungi. *New Phytologist* **140**, 709–714.
- Kiss, L. (2003) A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. *Pest Management Science* **59**, 475–483.
- Konstantinidou-Doltsinis, S., Markellou, E., Kasselaki, A.M., Siranidou, E., Kalamarakis, A., Tzembelikou, K., Schmitt, A., Koumakis, C. and Malathrakis, N. (2007) Control of powdery mildew of grape in Greece using Sporodex® L and Milsana®. *Journal of Plant Diseases and Protection* **114**, 256–262.
- Kotze, C., van Niekerk, J.M., Mostert, L., Halleen, F. and Fourie, P.H. (2011) Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathologia Mediterranea* **50**, 247–263.
- Kovács, C., Sándor, E. and Peles, F. (2014) Analysis of mycelial growth rate and mycoparasitic ability of different *trichoderma* isolates from grapevine trunks. *Analele Universităţii din Oradea, Fascicula Protecţia Mediului* vol. xxii.
- Kurtzman, C.P. and Droby, S. (2001) *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. *Systematic and Applied Microbiology* **24**, 395–399.
- Larignon, P. and Dubos, B. (1997) Fungi Associated with Esca Disease. *European Journal of Plant Pathology* **103**, 147–157.
- Larignon, P., Fontaine, F., Farine, S., Clement, C. and Bertsch, C. (2009) Esca and Black Dead Arm: two major actors of grapevine trunk diseases. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Biologie* **332**, 765–783.
- Latorre, B.A., Agosin, E., San Martin, R. and Vasquez, G.S. (1997) Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against *Botrytis* bunch rot of table grape in Chile. *Crop Protection* **16**, 209–214.

- Laveau, C., Letouze, A., Louvet, G., Bastien, S. and Guerin-Dubrana, L. (2009) Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. *Phytopathologia Mediterranea* **48**, 32–46.
- Lennartz, B., Schoene, P. and Oerke, E.C. (1998) Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grapevine and *Septoria* spp. on wheat. 50th International Symposium on Crop Protection: Mededelingen – Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen. Universiteit Gent **63**, 963–970.
- Lima, G., Ippolito, A., Nigro, F., Romanazzi, G., Schena, L., Gatto, M.A. and Salerno, M. (1996) Biological control of postharvest rots using *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila*. *Informatore Agrario* **52**, 79–84.
- Lima, G., Ippolito, A., Nigron, F. and Salerno, M. (1997) Biological control of grey mould of stored table grapes by pre-harvest applications of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila*. *Difesa-Delle-Piante* **20**, 21–28.
- Lima, G., De Curtis, F., Castoria, R. and De Cicco, V. (1998) Activity of the yeasts *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against post-harvest rots in different fruits. *Biocontrol Science and Technology* **8**, 257–267.
- Loper, J.E. and Buyer, J.S. (1991) Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **4**, 5–13.
- Lugtenberg, B. and Kamilova, F. (2009) Plant-growth-promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* **63**, 541–556.
- Maher, N., Piot, J., Bastien, S., Vallance, J., Rey, P. and Guerin-Dubrana, L. (2012) Wood necrosis in Esca-affected vines: types, relationships and possible links with foliar symptom expression. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **46**, 15–27.
- Martos, S., Andolfi, A., Luque, J., Mugnai, L., Surico, G. and 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**, 451–461.
- Masih, E.I., Slezack-Deschaumesa, S., Marmarasb, I., Ait Barkac, E., Vernetc, G., Charpentierb, C., Adholeyad, A. and Paula, B. (2001) Characterisation of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine. *FEMS Microbiology Letters* **202**, 227-232.
- Metz, C., Oerke, E.C. and Dehne, H.W. (2002) Biological control of grey mould (*Botrytis cinerea*) with the antagonist *Ulocladium atrum*. 54th International Symposium on Crop

- Protection Part I: Mededelingen – Faculteit Landbouwkundige En Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent **67**, 353–359.
- Milanović, V., Comitini, F. and Ciani, M. (2013) Grape berry yeast communities: Influence of fungicide treatments. *International Journal of Food Microbiology* **161**, 240–246.
- Mohamed, N., Lherminier, J., Farmer, M.J., Fromentin, J., Beno, N., Houot, V., Milat, M.L. and Blein, 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**, 611–620.
- Mounier, E., Cortes, F., Cadious, M. and Pajot, E. (2014) The benefits of *Trichoderma atroviride* I-1237 for the protection of grapevines against trunk diseases: from the nursery to the vineyard. *Phytopathologia Mediterranea* **53**, 591–592.
- Mugnai, L., Surico, G. and Esposito, A. (1996) Micoflora Associata al mal Dell'esca Della vite in Toscana. *Informatore Fitopatologico* **46**, 49-55.
- Mullins, M.G., Bouquet, A. and Williams, L.E. (1992) *Biology of the grapevine* (Cambridge University Press, Cambridge).
- Munkvold, G.P. and Marois, J.J. (1993) Efficacy of natural epiphytes and colonisers of grapevine pruning wounds or biological control of *Eutypa dieback*. *Phytopathology* **83**, 624–629.
- Musetti, R., Vecchione, A., Stringher, L., Borselli, S., Zulini, L., Marzani, C., D'Ambrosio, M., Sanità di Toppi, L. and Pertot, I. (2006) Inhibition of sporulation and ultrastructural alterations of grapevine downy mildew by the endophytic fungus *Alternaria alternata*. *Phytopathology* **96**, 689–698.
- Musetti, R., Polizzotto, R., Vecchione, A., Borselli, S., Zulini, L., D'Ambrosio, M., Toppi, L.S.D. and Pertot I. (2007) Antifungal activity of diketopiperazines extracted from *Alternaria alternata* against *Plasmopara viticola*: an ultrastructural study. *Micron* **38**, 643–650.
- Nally, M., Pesce, V., Maturano, Y., Muñoz, C., Combina, M., Toro, M., De Figueroa, L. and Vazquez, F. (2012) Biocontrol of *Botrytis cinerea* in table grapes by non-pathogenic indigenous *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated from viticultural environments in Argentina. *Postharvest Biology and Technology* **64**, 40–48.
- Nigro, F., Sialer Finetti, M.M. and Gallitelli, D. (1999) Transformation of *metschnikowia pulcherrima* 320, biocontrol agent of storage rot, with the green fluorescent protein gene. *Journal of Plant Pathology* **81**, 205–208.

- Olmo, H.P. (1986) The potential role of (*vinifera* x *rotundifolia*) hybrids in grape variety improvement. *Experientia* **42**, 921–926.
- Ownley, B. H., Pereira, R. M., Klingeman, W. E., Quigley, N. B., and Leckie, B.M (2004). *Beauveria bassiana*, a dual purpose biocontrol organism, with activity against insect pests and plant pathogens, In: Lartey RT, Caesar AJ, (Eds.), *Emerging Concepts in Plant Health anagement*, Research Signpost, India, pp.255–269.
- Ownley, B. H., Griffin, M. R., Klingeman, W. E. Gwinn, K. D., Moulton, J. K., and Pereira, R.M.(2008). *Beauveria bassiana* : endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology* **98**, 267–270.
- Ownley, B.H., Gwinn, K.D. and Vega, F.E. (2010) Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *Biocontrol* **55**,113–128.
- Palmieri, M.C., Perazzolli, M., Matafora, V., Moretto, M., Bachi, A. and Pertot, I. (2012) Proteomic analysis of grapevine resistance induced by *Trichoderma harzianum* T39 reveals specific defence pathways activated against downy mildew. *Journal of Experimental Botany* **63**, 6237–6251.
- Paul, B. (1999a) *Pythium periplocum*, an aggressive mycoparasite of *Botrytis cinerea* causing the gray mould disease of grape-vine. *FEMS Microbiology Letters* **181**, 277–280.
- Paul, B. (1999b) Suppression of *Botrytis cinerea* causing the grey mould disease of grapevine by an aggressive mycoparasite, *Pythium radiosum*. *FEMS Microbiology Letters* **176**, 25–30.
- Pearson, R.C. and Goheen, A.C. (1988) *Compendium of Grape Diseases* (St Paul, Minnesota, APS Press).
- Perazzolli, M., Dagostin, S., Ferrari, A., Elad, Y. and Pertot, I. (2008) Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. *Biological control* **47**, 228–234.
- Perazzolli, M., Roatti, B., Bozza, E. and Pertot, I. (2011) *Trichoderma harzianum* T39 induces resistance against downy mildew by priming for defence without costs for grapevine. *Biological control* **58**, 74–82.
- Petit, A.N., Wojnarowicz, G., Panon, M.L., Baillieul, F., Clément, C., Fontaine, F. and vaillant-Gaveau, N. (2009) Botryticides affect grapevine leaf photosynthesis without inducing defense mechanisms. *Planta* **229**, 497–506.
- Piccolo, S.L., Alfonzo, A., Giambra, S., Conigliaro, G., Lopez-Llorca, L.V. and Burruano, S. 2015. Identification of *Acremonium* isolates from grapevines and evaluation of their

- antagonism towards *Plasmopara viticola*. *Annals of Microbiology* doi: 10.1007/s13213-015-1082-5.
- Pieterse, C.M.J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C.M. and Bakker, P.A.H.M. (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual review of phytopathology* **52**, 347–375.
- Pitt, W.M., Huang, R., Steel, C.C. and Savocchia, S. (2013) Pathogenicity and epidemiology of *Botryosphaeriaceae* species isolated from grapevines in Australia. *Australian Plant Pathology* **42**, 573-582.
- Rajkovic, S., Markovic, M., Rajkovic, R. and Rakonjac, L. (2013) Biofungicide Trichodex WP. *The World Academy of Science, Engineering and Technology* **78**, 1703–1707.
- Raspor, P., Miklic-Milek, D., Avbelj, M. and Cadez, N. (2010) Biocontrol of grey mould disease on grape caused by *Botrytis cinerea* with autochthonous wine yeasts. *Food Technology and Biotechnology* **48**, 336–343.
- Reglinski, T., Elmer, P.A.G., Taylor, J.T., Parry, F.J., Marsden, R. and Wood, P.N. (2005) Suppression of *Botrytis* bunch rot in Chardonnay grapevines by induction of host resistance and fungal antagonism. *Australasian Plant Pathology* **34**, 481–488.
- Ronseaux, S., Clement, C. and Barka, E.A. (2013) Interaction of *Ulocladium atrum*, a potential biological control agent, with *Botrytis cinerea* and grapevine plantlets. *Agronomy* **3**, 632–647.
- Roudet, J. and Dubos, B. (2001) Efficacy and mode of action of *Ulocladium atrum* against grey mold on grapevine. *Bulletin OILB/SROP* **24**, 73–77.
- Rumbos, I. and Rumbou, A. (2001) Fungi associated with esca and young grapevine decline in Greece. *Phytopathologia Mediterranea* **40**, S330–S335.
- Santos, A. and Marquina, D. (2004) Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology* **150**, 2527–2534.
- Schweigkofler, W. (2006) Effect of fungicides on the germination of *Ampelomyces quisqualis* AQ10, a biological antagonist of the powdery mildew of the grapevine. *Integrated Protection in Viticulture, IOBC/WPRS Bulletin* **29**, 79–82.
- Sharma, R.R., Singh, D. and Singh, R. (2009) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control* **50**, 205–221.

- Serra, S., Mannoni, M.A. and Ligios, V. (2008) Studies on the susceptibility of pruning wounds to infection by fungi involved in grapevine wood diseases in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* **47**, 234–246.
- Sesan, T., Oprea, M., Podosu, C.A., Tica, C. and Oancea, F. (1999) Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grapevine with *Trichoderma* spp. and *Saccharomyces chevalieri*. *Bulletin of the Polish Academy of Biological Sciences* **47**, 197–205.
- Shoresh, M., Harman, G.E. and Mastouri, F. (2010) Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology* **48**, 21–43.
- Sparapano, L., De Leonardis, S., Campanella, A. and Bruno, G. (2001) Interaction between esca-associated fungi, grapevine calli and micropropagated shoot cultures of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* **40**, S423–S428.
- Sparapano, L., Bruno, G. and Graniti, A. (2001) Three-year observation of grapevines cross-inoculated with esca-associated fungi. *Phytopathologia Mediterranea* **40**, S376–S386.
- Sucharzewska, E., Dynowska, M., Kubiak, D., Ejdys, E. and Biedunkiewicz, A. (2012) *Ampelomyces hyperparasites* – occurrence and effect on the development of *Erysiphales* species under conditions. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **81**, 147–152.
- Sutton, B.C. (1980) *The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata.* Kew, UK: Commonwealth Mycological Institute.
- Thuerig, B., Binder, A., Boller, T., Guyer, U., Jimenez, S., Rentsch, C. and Tamm, L. (2006) An aqueous extract of the dry mycelium of *Penicillium chrysogenum* induces resistance in several crops under controlled and field conditions. *The European Journal of Plant Pathology* **114**, 185–197.
- Trouillas, F.P., Úrbez-Torres, J.R. and Gubler, W.D. (2010) Diversity of diatrypaceous fungi associated with grapevine canker diseases in California. *Mycologia* **102**, 319–336.
- Úrbez-Torres, J.R. and Gubler, W.D. (2011) Susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*. *Plant Pathology* **60**, 261–270.
- Utkhede, R.S. and Mathur, S. (2002) Biological control of stem canker of greenhouse tomatoes caused by *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Microbiology* **48**, 550–554.
- Van Wees, S.C.M., van der Ent, S. and Pieterse, C.M.J. (2008) Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 443–448.
- Vega, F.E., Posada, F., Aime, M.C., Pava-Ripoll, M., Infante, F. and Rehner, S.A. (2008) Entomopathogenic fungal endo-phytes. *Biological Control* **46**, 72–82.

- Vega, F.E., Goettel, M.S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M.A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N.K., Monzon, A., Ownley, B.H., Pell, J.K., Rangel, D.E.N. and Roy, H.E. (2009) Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2009.05.001>.
- Viala, P. (1926) Recherches sur les maladies de la vigne. Esca. Ann. Épipyt **12**, 5-108.
- Vidhyasekaran, P. (2004) Concise Encyclopedia of Plant Pathology (The Haworth Press. Binghamton, N.Y.619), pp.113.
- Yacoub, A., Gerbore, J., Magnin, N., Chambon, P., Dufour, M.C., Corio-Costet, M.F., Guyoneaud, R. and Rey, P. (2016) Ability of *Pythium oligandrum* strains to protect *Vitis vinifera* L., by inducing plant resistance against *Phaeoconiella chlamydospora*, a pathogen involved in Esca, a grapevine trunk disease. Biological Control **92**, 7–16.
- Zahavi, T., Cohen, L., Weiss, B., Schena, L., Daus, A., Kaplunov, T., Zutkhi, J., Ben-Arie, R. and Droby, S. (2000) Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. Postharvest Biology and Technology **20**, 115–124.
- Zimand, G., Elad, Y. and Chet, I. (1996) Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. Phytopathology **86**, 1255–1260.

Table1: Examples of biocontrol beneficial fungi and oomycet showing biocontrol properties against major grapevine foliar and trunk diseases

Disease	Biocontrol agent	Conditions	Mechanism of action	References
Downy Mildew	<i>Fusarium proliferatum</i> strain G6	<i>In vitro</i> / on leaf disks/in field	Mycoparasitism	Falk et al. 1996
	<i>F. proliferatum</i> strain G6 and strain 1505	On leaves	Not known	Bakshi et al. 2001
	<i>Alternaria alternata</i>	On leaf disks/in greenhouse	Toxin production	Musetti et al. 2006, 2007
	<i>Acremonium byssoides</i>	On leaves	Inhibitory metabolites production	Burruano et al. 2008
	<i>A. byssoides</i> strain A21	<i>In vitro</i>	Inhibitory metabolites production	Assante et al. 2005
	<i>Beauveria bassiana</i>	On leaves	Competition for space and nutrients, mycoparasitism, antibiosis, ISR	Jaber et al. 2015 Vega et al. 2008, 2009, Ownley et al. 2004, 2010
	<i>A. persicinum</i> CFs	<i>In vitro</i>	Inhibitory metabolites production	Piccolo et al. 2015
	<i>Penicillium chrysogenum</i> (Pen)	In field	ISR	Thuerig et al. 2006
	<i>Trichoderma harzianum</i> T39	In greenhouse	ISR	Perazzolli et al. 2008, 2011
Powdery Mildew	<i>Ampelomyces quisqualis</i>	In field On bark and leaves	Mycoparasitism	Falk et al. 1995b, Angeli et al. 2006, 2008
	<i>Pseudozyma flocculosa</i>	Under controlled conditions		Bélanger and Labbe 2002 Konstantinidou-Doltsinis et al. 2007
	<i>Tilletiopsis pallescens</i> , <i>T. minor</i> and <i>T. washingtonensis</i>	In leaf disks of in field	Enzyme production	Haggag et al. 2007
	<i>Verticillium lecanii</i>		Hyperparasite	Heintz and Blaich 1990
	<i>P. chrysogenum</i>	In greenhouse and in field	ISR	Thuerig et al. 2006
	<i>Pythium oligandrum</i>	On leaf disks	ISR	Gerbore et al. 2014

Grey mould	<i>T. harzianum</i> <i>T. harzianum</i> strain P1 <i>T. harzianum</i> strain T39	In field and greenhouse	Competition for space and nutrients, mycoparasitism, ISR	Harman et al. 1996 Latorre et al. 1996 Zimand 1996, Sesan et al. 1999, Elad 2000, Rajkovic et al. 2013
	<i>Ulocladium oudemansii</i>	In field, on bunches	Not described	Reglinski et al. 2005
	<i>Pythium</i> spp, <i>Pythium periplocum</i> and <i>Pythium radiosum</i>	On leaves	Mycoparasitism	Paul 1999a,b
	<i>P. oligandrum</i>	On growth chamber	ISR	Mohamed et al. 2007
	<i>Acremonium cephalosporium</i> strain B11	On detached berries	Spatial and nutrient competition	Zahavi et al. 2000
	<i>Cryptococcus laurentii</i> LS-11 and <i>Rhodotorula glutinis</i> LS-28	On detached berries	Spatial and nutrient competition	Lima et al. 1998
	<i>Aureobasidium pullulans</i> (isolate LS-30)	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i>	Spatial and nutrient competition and enzyme production	Lima et al. 1996, Castoria et al. 2001
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> isolate 320, <i>M. fructicola</i> strain Y-27328	On grape	Spatial and nutrient competition	Nigro et al. 1999, Kurtzman and Droby 2001
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> and <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	On berries	Spatial and nutrient competition	Nally et al. 2012
	<i>Candida sake</i> CPA-1	In field	Spatial and nutrient competition	Cañamàs et al. 2011, Calvo-Garrio et al. 2013 a,b.
	<i>Candida guilliermondii</i> A42	On detached berries	Spatial and nutrient competition	Zahavi et al. 2000
	<i>Pichia membranifaciens</i> 101	<i>In vitro</i>	Enzyme production	Masih et al. 2001

Grapevine trunk diseases (GTD) <i>Esca</i>	<i>Trichoderma</i> formulation	In nurseries	Spatial and nutrient competition/Mycoparasitism	Fourie and Halleen 2004, 2006
	<i>Trichoderma harzianum</i>	On shoots	Spatial and nutrient competition/Mycoparasitism	Di Marco et al. 2004, Di Marco and Osti 2007.
	<i>Trichoderma asperellum</i> and <i>Trichoderma gamsii</i>	In field	Spatial and nutrient competition/Mycoparasitism	Aloi et al. 2015
	<i>Trichoderma atroviride</i> , <i>T. harzianum</i> , <i>Trichoderma</i> spp. (USPP-T1 and USPP-T2)	<i>In vitro</i> /In field	Spatial and nutrient competition/Mycoparasitism	Kotze et al. 2011
	<i>Trichoderma atroviride</i>	In field	Spatial and nutrient competition/Mycoparasitism	Mounier et al. 2014
	<i>P. oligandrum</i>	In greenhouse	ISR	Yacoub et al. 2016
	<i>T. atroviride</i> stain I237	In field	Spatial and nutrient competition/Mycoparasitism	Mounier et al. 2014
	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>In vitro</i>	Overgrowth	Kovac et al. 2014, Kotze et al. 2011
	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>In vitro</i>	Overgrowth	Kotze et al. 2011
	<i>T. harzianum</i> AG5, eco 77, Ag11band Birich	<i>In vitro</i>	Mycoparasitism	Kotze et al. 2011
<i>Eutypa dieback</i>	<i>Trichoderma</i> sp. USPP-T1	In field	Spatial and nutrient competition/Mycoparasitism	Halleen et al. 2010, Johne et al. 2005
	<i>Fusarium lateritium</i>	In field		Mukvold and Maroi 1993

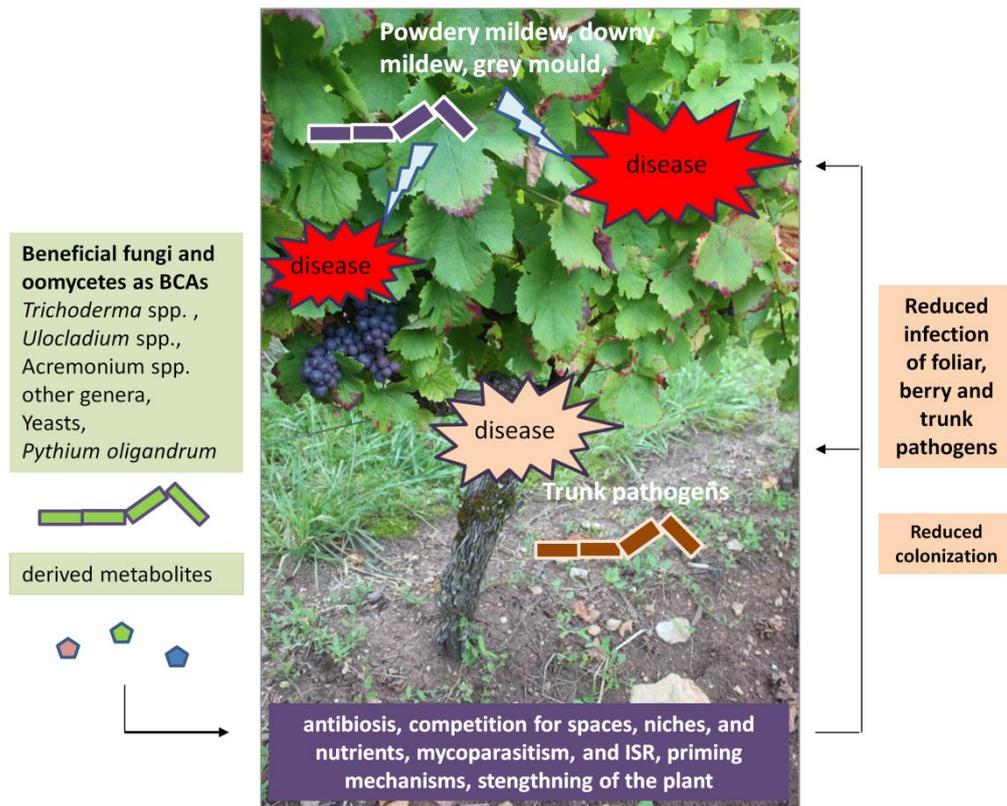


Figure 1. Drawing summarizing the use of fungi and oomycetes to control powdery and downy mildews, grey mould, and grapevine trunk diseases.

Les agents de lutte biologique les plus étudiés sont *B. subtilis*, *Pseudomonas* spp. *Trichoderma* spp. et *Fusarium oxysporum*. D'autres micro-organismes comme l'oomycète, *P. oligandrum*, ont suscité un intérêt croissant au cours de la dernière décennie (Benhamou et al., 2012 ; Rey et al., 2008) en raison de leurs propriétés remarquables et de leur capacité à agir non seulement sur l'agent pathogène mais aussi sur la plante via la stimulation du « système immunitaire » végétal (Benhamou et al., 2012 ; Rey et al., 2008).

4. *Pythium oligandrum*, agent de lutte biologique

P. oligandrum a été décrit pour la première fois en 1930 aux Etats-Unis par Dreschler (McQuilken, 1990). Il est considéré comme non pathogène et a été utilisé comme agent de biocontrôle sur de nombreuses plantes dont la tomate, la vigne, le blé (Gerbore et al., 2014a). Le contrôle biologique exercé par *P. oligandrum* peut s'effectuer directement en agissant sur le pathogène par antibiose, mycoparasitisme, compétition nutritive ou indirectement, en stimulant le système de défense de la plante (Benhamou et al., 2012 ; Gerbore et al., 2014a).

4.1. Action directe

Mycoparasitisme

Lorsque *P. oligandrum* interagit avec les champignons (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL), *Rhizoctonia solani*, *Verticillium albo-atrum*), il émet des enzymes hydrolytiques : des chitinases, cellulases, glucanases, lipases. Le rôle de ces enzymes consiste à dégrader les composants des parois cellulaires (chitine, glucane, cellulose) au niveau des sites de pénétration de l'antagoniste (Benhamou et al., 1997, 1999). Le processus de mycoparasitisme commence par une perturbation de la paroi cellulaire ce qui entraîne sa rupture. L'interaction de *P. oligandrum* avec *R. solani* est remarquable car ce dernier met en place un système de défense via un dépôt de matériel pariétal au niveau des sites de pénétration de l'antagoniste. Cependant *P. oligandrum* a la capacité d'altérer localement ces accumulations en chitine chez les hyphes de *R. solani*.

L'antibiose

Elle consiste à altérer les hyphes du pathogène en l'absence de contact physique avec l'antagoniste. Lors de l'interaction *P. oligandrum/Phytophthora megasperma*, des observations structurales et cyto-chimiques ont révélé des dommages importants au niveau des cellules de *P. megasperma* (Benhamou et al., 1999). De plus, les dommages observés : rétraction de la

membrane plasmique et désorganisation du cytoplasme, seraient dus à la diffusion et à la pénétration de molécules antibiotiques. Bradshaw et al. (1991) ont montré que *P. oligandrum* produit des molécules antibiotiques volatiles qui réduisent le taux de croissance de deux pathogènes majeurs responsables des pourritures racinaires du pois, *Phoma medicaginis* var. *pinodella* et *Mycrosphaerella pinodes*. A ce jour ces molécules n'ont cependant pas été purifiées.

4.2. Action indirecte

Promotion de croissance

Les suspensions d'oospores ou de mycelium de *P. oligandrum* inoculées, à des graines ou à des plants matures, entraînent une promotion de la croissance de la plante (Cothier et Gilbert, 1993). Wulff et al. (1998) ont montré qu'un traitement des graines de concombre par une suspension d'oospores entraîne une stimulation de l'élongation des racines, huit jours après inoculation par l'oomycète.

Le Floch et al. (2003a) ont montré que *P. oligandrum* produisait des molécules auxiniques, principalement de la tryptamine (TNH₂), mais non de l'acide indole-3-acétique (AIA) ou du tryptophol (TOL) comme certaines autres espèces de *Pythium* en ont la capacité. Lors de l'interaction entre *P. oligandrum* et de jeunes plants de tomate, l'enrichissement de la solution nutritive des plantes en tryptophane, sa métabolisation en TNH₂ par le champignon suivi de son absorption par le végétal est associée avec une augmentation du nombre et du poids des racines. Chez la tomate la voie de la tryptamine est considérée comme mineure pour la production d'auxines, mais un apport modéré de TNH₂ d'origine fongique favoriserait le développement du végétal, alors qu'à l'inverse de fortes concentrations en TNH₂ perturberait l'équilibre hormonal de la plante.

Induction de résistance

L'inoculation de nombreuses espèces de plantes (tomate, betterave à sucre, vigne, etc.), par *P. oligandrum* peut induire une résistance contre différents agents pathogènes (*B. cinerea*, *Cercospora beticola*, *FORL*, *P. ultimum*, *R. solani*) (Benhamou et al., 1997 ; Le Floch et al., 2003b ; Mohammed et al., 2007 ; Takeneka et al., 2006). Par exemple, un traitement des racines de la tomate par une suspension mycélienne de *P. oligandrum* réduit la sévérité du flétrissement bactérien causé par *Ralstonia solanacearum*. Cette résistance est produite suite à l'accumulation de l'éthylène et la surexpression des protéines PR (Hase et al.,

2006). En 2008, Hase et al. ont montré que la résistance induite contre cette maladie était également due à l'activation de la voie de signalisation de l'acide jasmonique. L'acide salicylique n'interviendrait pas dans cette résistance. *P. oligandrum* présente la capacité d'induire les réactions de défenses chez la plante grâce à la présence de protéines dites « elicitin-like ». Pour rappel, les élicitines sont une famille de protéines élicitrices extracellulaires sécrétées, ou produite à la surface des cellules, par les *Phytophthora* spp. et *Pythium* spp. Les protéines « elicitin-like » de *P. oligandrum* appartiennent à deux groupes : les POD-1 et POD-2 sont localisée dans la paroi cellulaire (Cell Wall Protein, CWP) (Masunaka et al., 2010) alors que l'oligandrine est extracellulaire (Picard et al., 2000b).

L'oligandrine est une molécule de faible poids moléculaire (10-kDa) qui ne provoque pas de réponse hypersensible (Mohammed et al., 2007). Chez la vigne, le traitement des racines par l'oligandrine entraîne un niveau de protection contre *B. cinerea* de 75%. Cette protection résulte, entre autre, de la modification de l'épaisseur de la cuticule et de l'accumulation des composés phénoliques au niveau des sites de pénétration du pathogène. Au niveau moléculaire, la RT-PCRq a montré une surexpression de gènes qui code pour des protéines PR (β -1,3 glucanases) et des stilbènes (voie des phytoalexines) en présence du pathogène (Mohammed et al., 2007). Chez la tomate, le traitement des plants par l'oligandrine induit une résistance systémique contre le pathogène *Phytophthora parasitica* (Picard et al., 2000a) et *FORL* (Benhamou et al., 2001). La réaction de l'hôte se manifeste principalement par l'occlusion des espaces intercellulaires par un matériel d'origine phénolique, pour limiter la progression du pathogène, ainsi que par la formation d'appositions au niveau des sites de pénétration (Picard et al., 2000a).

Les protéines de la paroi cellulaire CWP, POD-1 et POD-2 ont également des propriétés intéressantes pour protéger les plantes (Takenaka et al., 2006 ; Masunaka et al., 2010). Takenaka et Tamagake (2009) ont montré qu'un traitement foliaire de la betterave à sucre avec une fraction de protéines de la paroi cellulaire de *P. oligandrum* induit la résistance chez cette plante contre *C. beticola*. Les résultats suggèrent que les CWP n'agissent pas sur le développement du pathogène mais, elles se fixent au niveau de la surface foliaire et induisent l'expression des gènes de défense. En effet, les analyses par Northern Blot de l'expression de 4 gènes de défenses (β -1, 3-glucanase, chitinase classe III, 5-enol-pyruvylshikimate-phosphate synthase et oxalate oxidase-like germin) ont montré un niveau d'expression plus élevé de ces gènes au niveau des plantes traités par les CWP par rapport aux témoins. Pour mieux comprendre le rôle de ces élicitines, Takenaka et al. (2006) ont étudié l'effet d'un traitement

par une fraction cellulaire contenant POD1 et POD2 sur l'induction des défenses de la betterave à sucre. Cette étude réalisée a montré un niveau d'expression élevé de 5 gènes (oxalate oxidase-like germin, glutathione S transferase, 5-enol-pyruvylshikimate-phosphate synthase, phenylalanine ammonia-lyase et l'aspartate aminotransferase) impliqués dans les défenses de la plante par rapport aux plants témoins.

5. Les systèmes de défense chez les végétaux

Afin de se protéger contre les attaques par des bioagresseurs, les végétaux grâce à leur système immunitaire peuvent mettre en place un système de défense complexe caractérisé par deux grands types de défenses, celles dites « passives » et celles appelées « actives ». La relation hôte-parasite qui s'établit va être caractérisée par des états d'équilibre ou de rupture entre la capacité de l'agent pathogène à coloniser et endommager la plante et les mécanismes de défense mis en place par cette dernière.

5.1. Les défenses passives

Les plantes possèdent des barrières physico-chimiques naturelles souvent suffisantes pour se protéger des organismes potentiellement pathogènes. Les défenses passives ou constitutives, sont localisées au niveau de chaque partie de la plante (racines, tige, feuilles, etc.), elles sont constituées par des barrières physiques (l'écorce, l'épiderme, cuticule, etc.) et chimiques (toxines et exsudats antimicrobiens : les phytoanticipines) (Wittstock et Gershenzon, 2002).

5.2. Les défenses actives

Dans les cas où le bioagresseur réussit à contourner cette première ligne de défense, des mécanismes de défense, non préexistants au niveau de la plante, peuvent alors se mettre en place. Ils permettront de confiner l'agent pathogène au niveau du site d'infection ou arrêteront sa progression dans les tissus végétaux. Lorsque la plante reconnaît l'agent pathogène et met en place rapidement des réactions de défense efficaces, l'interaction est dite incompatible et la plante développe une résistance contre l'agent pathogène. Dans le cas contraire, l'absence de reconnaissance du bioagresseur, ou le contournement des mécanismes de défenses du végétal par l'agent pathogène, sont typiques d'une interaction compatible et la plante est dite sensible.

5.3. Reconnaissance de l'agent pathogène

La reconnaissance de l'agent pathogène par la plante est initiée par la perception de molécules appelées éliciteurs généraux ou « Pathogen-Associated Molecular Pattern » (PAMPs) ou « Microbial-Associated Molecular Pattern » (MAMPs) (Nürnberger et Brunner, 2002 ; Parker, 2003 ; Jones et Dangl, 2006). Ces molécules peuvent avoir une origine exogène lorsqu'ils proviennent du pathogène ou endogène lorsqu'elles sont produites par la plante. De nombreux PAMP ont été isolés de bactéries, champignons ou oomycètes. La nature des éliciteurs est très diverse, les plus fréquents sont les oligosaccharides, les lipides, les polypeptides, les glycoprotéines, la flagelline et les acides (acide salicylique et ses analogues, acide jasmonique ou ses dérivés, etc.) (Felix et al., 1999 ; Bouizgarne et al., 2006 ; Samadi et Behboodi, 2006). Ces molécules sont reconnues par des récepteurs de la plante appelés Pattern-Recognition Receptors (PRRs) localisés à la surface des cellules (figure 7). La perception de ces éliciteurs généraux par la plante déclenche l'induction des mécanismes de défenses basales ou PAMP-Triggered Immunity (PTI) (Boller et Felix, 2009 ; Jones et Dangl, 2006). Chez la vigne, plusieurs éliciteurs de différentes origines ont été appliqués sur des cultures cellulaires, feuilles, baies et racines afin de stimuler les défenses contre différents agents pathogènes. Ces éliciteurs comprennent : le chitosane, l'acide salicylique, l'ergosterol, la flagelline, le glucane éthylène, etc (Delaunois et al., 2013).

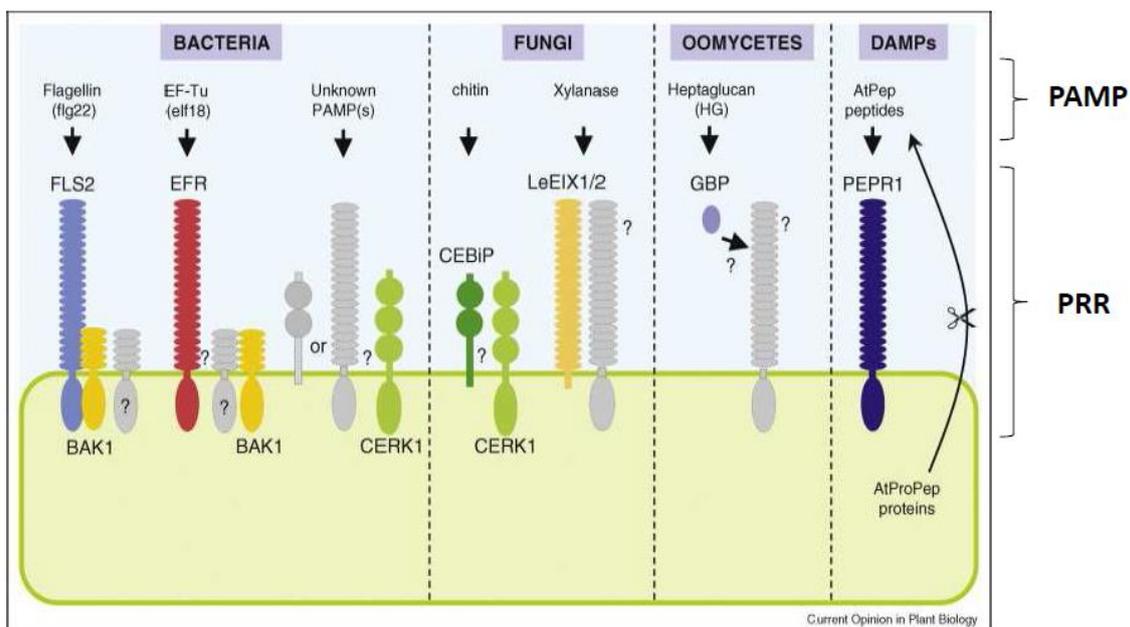


Figure 7 : Reconnaissance des PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern) par les récepteurs de type PRR (pattern recognition receptor) chez les plante (Boller et Felix, 2009)

Certains agents pathogènes réussissent à contourner la première ligne de défense basale (la PTI) en produisant des molécules effectrices interférant avec la PTI. La perception de ces effecteurs par la plante déclenche l'immunité secondaire : Effector Triggered Immunity (ETI) (figure 8). Ces molécules sont sécrétées par des agents pathogènes d'origines très diverses, des bactéries, des champignons ou des oomycètes (Chisholm et al., 2006 ; Gohre et Robatzek, 2008 ; ; Schornack et al., 2009 ; Stergiopoulos et de Wit 2009). Les effecteurs peuvent être des protéines codées par des gènes d'avorulence *avr* qui seront reconnus par les produits des gènes de résistance *R* de la plante (théorie gène pour gène décrite par Flor, 1956).

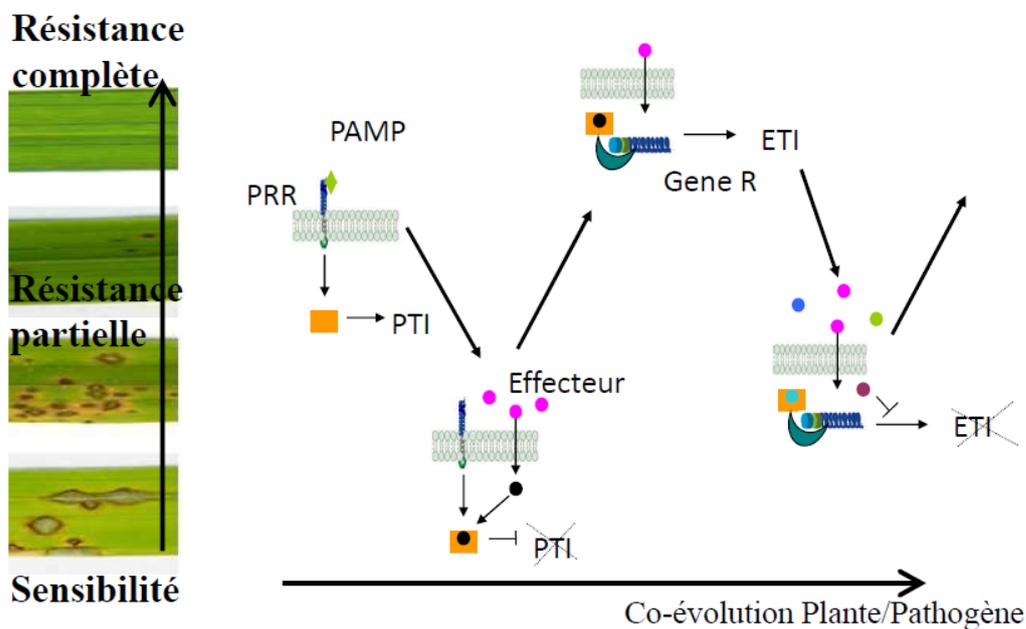


Figure 8 : Représentation du modèle d'évolution en Zig Zag de l'évolution du système immunitaire chez les plantes (d'après Jones et Dangl, 2006). PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern, PRR : pattern recognition receptor, PTI : PAMP-Triggered Immunity, ETI: Effector Triggered Immunity

La plupart des gènes de résistance impliqués dans l'ETI appartiennent à une famille de protéines qui partagent des motifs structuraux communs nommés « sérine/thréonine kinases », ou « extracellulaire Leucine Rich Repeat » (LRR), ou « Coiled-Coil » (CC), « Nucleotide Binding Site » (NBS) ou « Toll Interleukine Receptor » (TIR) (figure 9).

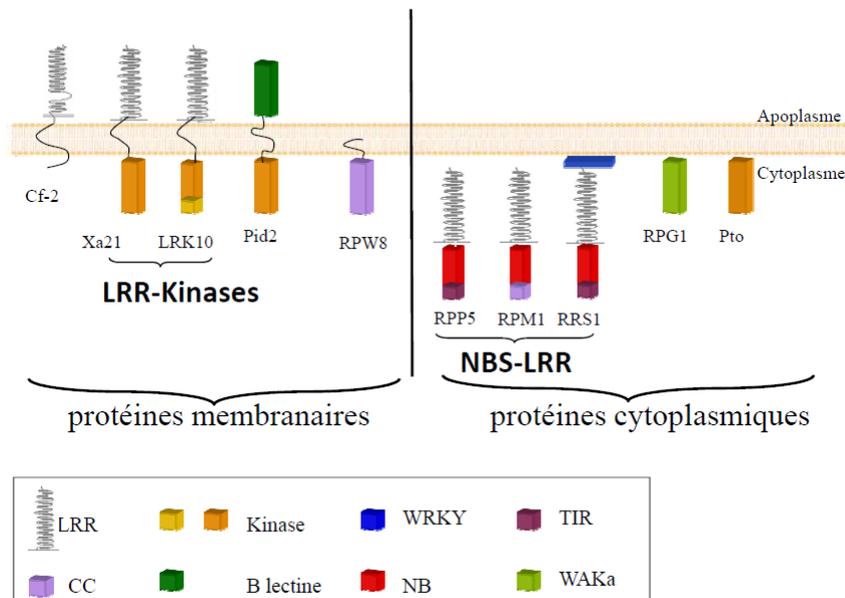


Figure 9 : Représentation de la localisation et la structure des principales classes de protéines impliquées dans l'ETI (d'après Dangl et Jones, 2001). TIR : Toll Interleukine Receptor, CC : Coilde Coil, NB : Nucleotide Binding, LRR : Leucine Rich Repeat.

5.4. La signalisation cellulaire

La signalisation intracellulaire

Suite à la reconnaissance d'un éliciteur, la perméabilité au niveau de la membrane plasmique est modifiée et des échanges d'ions entre les milieux intra et extracellulaires sont observés. Ces changements incluent des influx de Ca^{2+} et de H^+ et des efflux de K^+ , et d'anions, en particulier du Cl^- , par des canaux ioniques (Zhao et al., 2005). L'influx de H^+ provoque une alcalinisation du milieu extracellulaire, ce qui est généralement toxique pour les agents pathogènes (Gerber et Durbery, 2004). Le Ca^{2+} est considéré comme un messenger secondaire majeur puisqu'il peut activer plusieurs événements dans la cellule végétal comme l'ouverture des canaux ioniques et des protéines kinases calcium-dépendantes (Dodd et al., 2010).

Ces flux d'ions agissent en amont de la production de Formes Actives de l'Oxygène (FAO) et de la cascade de phosphorylation impliquant des protéines kinases de types Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK). Les FAO sont produites intensément durant les premières étapes de la signalisation du stress (Garcia-Brugger et al., 2006). Lima et al. (2012) ont montré que lorsque des cultures cellulaires de *V. vinifera* L. sont inoculées avec de la

biomasse de *P. chlamydospora* autoclavée, la production de FAO est détectée 1 à 5 heures après le traitement. L'anion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont les FAO majoritairement produites après reconnaissance d'un agresseur (Lamb et Dixon, 1997 ; Torres et al., 2006). Ces FAO contribuent à limiter le développement du pathogène de 2 façons : (i) directement grâce à leur action toxique sur le pathogène ou bien (ii) indirectement en renforçant la paroi cellulaire (Bradely et al., 1992) et en activant les MAPKs impliquées dans la cascade de signalisation cellulaire (Lamb et Dixon, 1997). L'accumulation de composés oxygénés ou « burst oxydatif » est impliqué dans la mise en place de la réaction d'hypersensibilité (RH). Différentes enzymes répondent au stress oxydatif. L'induction de gènes codant pour ces enzymes peut donc renseigner sur le niveau du stress oxydatif de la cellule végétale *e.g.* certains gènes qui codent pour les glutathion S-transferases (Gsts).

La voie des MAPKs est une composante importante dans la transduction des stimuli extracellulaires en réponses intracellulaires, car elle est située en aval des récepteurs et en amont des facteurs de transcription. Cette voie se caractérise par des cascades successives d'activation des MAPKs après la perception d'un agent pathogène (Zhang et Kesslig, 2001). Elle permet d'acheminer le signal depuis la surface des cellules jusqu'au noyau. La MAPK activée influence divers phénomènes : la production des FAO et de messagers secondaires, l'expression des gènes de défense de la plante et la réaction hypersensible (Rodriguez *et al.* 2010 ; Xiong et Zhu, 2001). En effet, Asai *et al.* (2002) ont mis en évidence l'intervention d'une cascade complète de 3 MAPKs (MEKK1, MKK4/5 et MPK3/6) qui permettent l'activation de facteurs de transcription de type WRKY. Ces facteurs de transcription, activent la transcription des gènes de défense et exercent un rétrocontrôle positif sur leur propre expression.

La mobilisation de ces acteurs (flux ionique, FAO et MAPK) conduit à l'activation de facteurs de transcription concourant à une reprogrammation du transcriptome et à la mise en place de réponses de défenses via l'expression des gènes appropriés.

La signalisation intercellulaire

Afin de généraliser les réponses de défense à la plante entière, certaines phytohormones interviennent dans la signalisation intercellulaire pour assurer la communication entre les cellules infectées et celles saines. Cette communication est principalement réalisée grâce à trois phytohormones : l'acide jasmonique (AJ), l'acide salicylique (AS) et l'éthylène (ET) (Bari et Jones, 2009 ; Kachroo et Kachroo, 2007). Selon

l'infection par un bioagresseur, différentes voies seront favorisées. Généralement, les agents pathogènes nécrotrophes induisent la voie de AJ/ET, alors que les biotrophes induisent la voie de AS (Thomma et al., 2001). Il est important de noter que ces voies de signalisation s'interconnectent et s'autorégulent via des événements d'activation ou de répression.

Le AS est un messenger important car il est impliqué dans la défense locale mais aussi dans la résistance systémique acquise (SAR) en stimulant l'expression de certains gènes codant pour les protéines de type Pathogenesis Related (PR) (Ryals et al., 1996). La synthèse de AS se fait par la voie des shikimates-phénylprpanoïdes, il est obtenu à partir de la phénylalanine via l'acide benzoïque grâce à la Phénylalanine Ammonia Lyase (PAL) et une hydroxylase de l'acide benzoïque (BA2H) (figure 10). La voie du chorismate permet aussi de produire de l'AS grâce au réservoir de chorismate dans les chloroplastes. Chez la vigne, plusieurs études ont montré que l'application de l' AS stimule l'accumulation des protéines PR aux niveaux de différents tissus, *e.g.* cultures cellulaires, racines, feuilles, tiges et baies (Busam et al., 1997 ; Renault et al., 1996 ; Derckel et al., 1998).

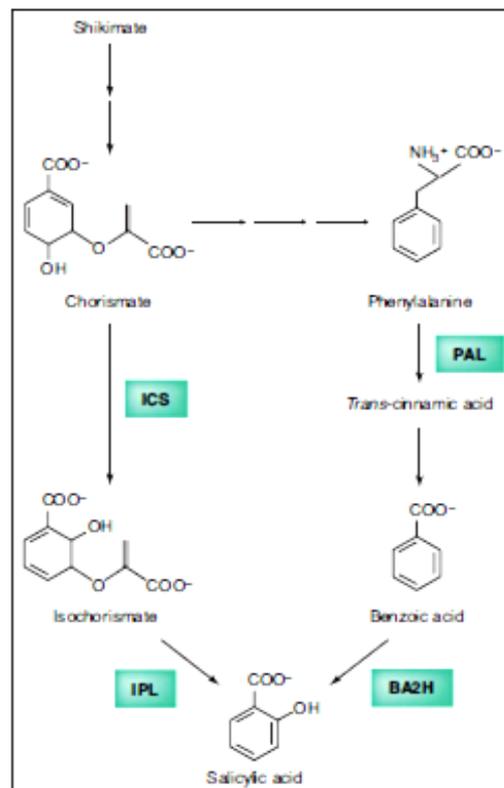


Figure 10 : Les deux différentes voies impliquées dans la biosynthèse de l'acide salicylique (Shah, 2003 ; Wildermuth et al., 2001). PAL : Phénylalanine Ammonia Lyase, BA2H : hydroxylase de l'acide benzoïque, ICS : Isochorismates synthase, IPL : Isochorismate pyruvate lyase

L'AJ appartient à la famille des oxylipines, il est issu du catabolisme des lipides membranaires de la cellule végétale et provient de l'action de la lipoxigénase LOX13 sur l'acide linoléique par (Howe et Schilmiller, 2002). Si l'AJ est le produit final de cette voie, des intermédiaires et des dérivés sont également biologiquement actifs, *e.g.* le méthyljasmonate (MeJA) ou l'acide 12-oxo-phytyldièneoïque. L'AJ seul ou avec l'ET induit de nombreux facteurs de transcription qui agissent sur des gènes de défenses codant pour la synthèse des phytoalexines et de PR protéines. Chez la vigne, le MeJA induit l'induction de certains gènes codant pour des PR protéines (Repka et al., 2004 ; Belhadj et al., 2008 ; Faurie et al., 2009) et des phytoalexines (Faurie et al., 2009) et de l'AS (Belhadj et al., 2008) sur cultures cellulaires.

L'ET dérive de la méthionine via l'action enzymatique de l'ACC synthase sur l'acide 1-aminocyclopropane-1 carboxylique (ACC). La production précoce de l'ET est perçue par des récepteurs spécifiques (ETR) qui lèvent l'inhibition sur une voie métabolique : cascade protéique (EINs) impliquée dans l'activation de facteurs de transcriptions (EIN3 et EIL1) pour des gènes de défense et de croissance cellulaire (Guo et Ecker, 2004). La voie de l'éthylène est impliquée dans la stimulation des protéines PR (Martinez et al., 2001) et la production de composés antifongiques (Graham et Sticklen, 1994).

5.5. Les réponses de défenses induites

Le renforcement pariétal

Le renforcement de la paroi cellulaire se fait par l'accumulation de molécules nouvellement synthétisées comme la lignine et la callose. Parmi les réactions impliquées, une des plus fréquentes est la synthèse de la callose (polymère de β -1,3 glucane) sous l'action de la callose synthase (CALS). Le dépôt de callose est souvent observé à proximité du point d'attaque du pathogène, notamment des haustoria. Plusieurs études ont mis en évidence l'implication de la callose dans la défense de plusieurs espèces de plantes à différents pathogènes, traitées ou non par des inducteurs de résistance (Hamiduzzaman et al., 2005 ; Trouvelot et al., 2008 ; Ahn et al., 2007 ; Zimmerli et al., 2000). Les FAO sont fortement impliquées dans ce renforcement pariétal, en promouvant la polymérisation des alcools cinnamoyls conduisant à la lignification des parois cellulaires (Huckelhoven, 2007). En effet, le polymère lignine résulte de la polymérisation de trois monolignols : l'alcool p-coumarylique, l'alcool coniférylique (obtenu à partir de la coniférine sous l'action d'une enzyme appelée Coniferyl Alcohol GlucosylTransferase, CAGT) et l'alcool sinapylique. La

polymérisation de la lignine s'effectue par la déshydrogénation des monolignols. Cette déshydrogénation fait intervenir des enzymes comme la peroxydase (PER) et les oxydases (laccases) (Boudet et al., 1995). Cette lignification confère à la paroi une meilleure résistance à la pression mécanique exercée par exemple lors de la pénétration des hyphes ou de l'appressorium d'un champignon (Bechinger et al., 1999).

La synthèse des métabolites secondaires

Les phytoalexines, molécules de faibles poids moléculaires, sont les principaux métabolites secondaires produits par la plante en réponse à un éliciteur biotique ou abiotique (Kuc et al., 1995). Ce sont des molécules antimicrobiennes non enzymatiques. Quatre familles de phytoalexines ont été répertoriées : les phénylpropanoïdes, les terpénoïdes, les polykétides et les indoles soufrés (figure 11). On trouve, par exemple, les sesquiterpènes chez les solanacées, les stilbènes quant à eux sont produits par la vigne, le pin ou la cacahuète. Les phénylpropanoïdes dérivent de l'acide aminé phenylalanine. Sous l'action de différentes enzymes qui interviennent successivement PAL (Phénylalanine Ammonia-Lyase), C₄H (Coumarate 4-Hydroxylase) et 4CL (4-Coumarate CoA Ligase), cet acide aminé se transforme en p-coumaryl-CoA. Ce dernier présente un rôle crucial dans la synthèse des phénylpropanoïdes. En effet, il conduit à la formations des stilbènes, flavonoïdes et lignines sous l'action de la chalcone synthase (CHS), la stilbène synthase (STS) et la cinnamoyl-CoA reductase (CCR), respectivement.

Chez la vigne, la phytoalexine majoritaire est le trans-resvératrol (3,4',5-trihydroxystilbène) appartenant à la famille des stilbènes. Celui-ci peut subir différentes réactions pour former d'autres composés comme l' α/ϵ -viniférine, le picéide ou le ptérostilbène. L'inoculation de *P. viticola* entraîne une induction des gènes impliqués dans la synthèse des phytoalexines (CHS, STS et CHI), ce qui va conduire à une production de molécules comme les catéchines (isoflavonoïdes). Ces dernières affectent négativement la croissance mycélienne et la sporulation de cet oomycète (Dai et al., 1995 ; Kortekamp et Zyprian, 2003). Des métabolites secondaires, les oxylipines, qui dérivent des acides gras, peuvent aussi avoir un rôle dans les défenses de la plante. Ce sont des composés oxygénés qui sont formés à partir des lipides membranaires sous l'action de la lipoxigénase (LOX9) (Vollenweider et al., 2000). Ces molécules ont un effet antimicrobien et interviennent dans la régulation de la mort cellulaire (Prost et al., 2005).

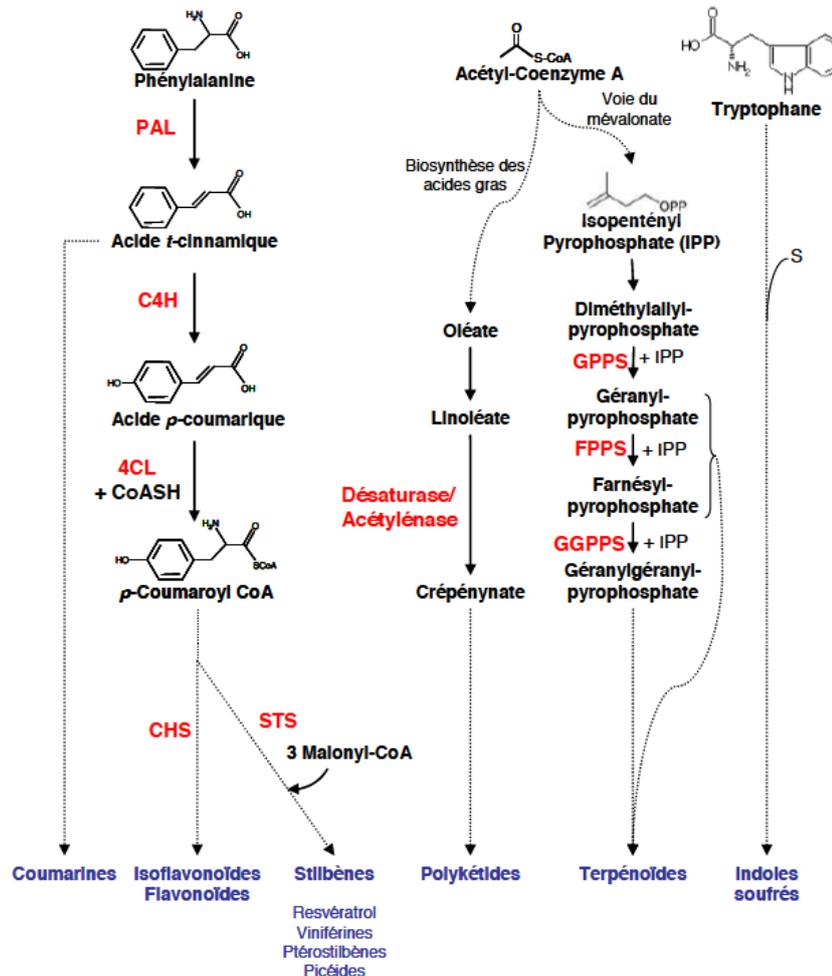


Figure 11 : Représentation simplifiée des voies de biosynthèse des phytoalexines. PAL : phénylalanine amonialyase ; C4H : cinnamate-4-hydroxylase ; 4CL : 4-coumarate:CoA ligase ; STS : stilbène synthase ; CHS : chalcone synthase ; GPPS : géranylpyrophosphate synthase ; FPPS : farnésylpyrophosphate synthase. Les flèches en pointillés indiquent la présence d'intermédiaires réactionnels (Le Hénanff, 2009)

La synthèse de protéines PR

Les protéines PR sont liées à la pathogénèse et ont été décrites chez de nombreuses espèces de plantes en réponse à un stress biotique. Elles ont été initialement découvertes chez le tabac en 1970 par Van Loon et Van Kammen. Selon leurs propriétés biochimiques et biologiques, elles ont été classées en 17 familles (Van Loon et al., 2006) (Tableau 1). Certaines protéines PR exercent une activité hydrolytique sur les composés de la paroi cellulaire du pathogène, ce sont les β -1,3-glucanases (PR-2) et les chitinases (PR-3, PR-4, PR-8 et PR-11). La PR-5 présente des propriétés de type osmotines qui perturbent la perméabilité membranaire des hyphes des agents pathogènes (Van Loon, 1997). Les PR-6 sont des inhibiteurs de protéase qui bloquent les protéines digestives des pathogènes. Les PR-9 sont

des peroxydases qui participent au renforcement de la paroi cellulaire de la plante (Van Loon et al., 2006).

Les PR-12 (défensines), PR-13 (thionines) et certaines protéines de transfert de lipides (PR-14) ont des propriétés antimicrobiennes alors que les défensines ont vraisemblablement une action insecticide (Van Loon et al., 2006). La PR1, dont la fonction est inconnue, est souvent utilisée comme un marqueur de la résistance systémique acquise (voie SA-dépendante) (Pieterse et al., 2014).

Tableau 1 : Familles de protéines PR (Van Loon et al., 2006)

Protéine PR	Membre type	Activité enzymatique	Cible
PR-1	Tabac PR-1a	Inconnue	Non déterminée
PR-2	Tabac PR-2	β -1,3-glucanase	Glucanes de paroi
PR-3	Tabac P, Q	Chitinase de type I à VII	Chitine de paroi
PR-4	Tabac R	Chitinase de type I, II	Chitine de paroi
PR-5	Tabac S	Osmotine	Membrane
PR-6	Tomate, inhibiteur I	Inhibiteur de protéase	Non déterminée
PR-7	Tomate P69	Endoprotéase	Non déterminée
PR-8	Concombre, chitinase	Chitinase de type VIII	Chitine de paroi
PR-9	Tabac 'lignin-forming peroxidase'	Péroxydase	Non déterminée
PR-10	Persil, PR1	RNase	Non déterminée
PR-11	Tabac chitinase de type V	Chitinase de type I	chitine de paroi
PR-12	Radis Rs-AFP3	Défensine	Membrane
PR-13	Arabette THI2.1	Thionine	Membrane
PR-14	Orge LTP4	LTP	Membrane
PR-15	Orge OxOa (germine)	Oxalate oxydase	Non déterminée
PR-16	Orge OXOLP	Oxalate oxydase-like	Non déterminée
PR-17	Tabac PRp27	Inconnue	Non déterminée

La réponse hypersensible (RH)

L'hypersensibilité (ou RH) est une forme de mort cellulaire génétiquement programmée qui est localisée sur le végétal au niveau du site d'infection du pathogène. Au niveau de ces cellules mortes, une production importante de FAO et de phytoalexines est aussi observée. La RH est typiquement associée à l'apparition de petites lésions nécrotiques sur le végétal. Deux rôles sont fréquemment attribués à la RH : (i) la mort des cellules végétales entourant l'agent pathogène va perturber son développement, en réduisant l'accès aux nutriments (Dangl et al., 1996), (ii) son rôle de signal d'alarme envers les cellules saines qui

vont alors mettre en éveil leur système de défense. Souvent, la RH est à l'origine de la résistance systémique acquise.

5.6. La résistance systémique

Deux types de résistance systémique ont été définis : la SAR (résistance systémique acquise) qui est mise en place par la plante suite à l'attaque de l'agent pathogène et l'ISR (résistance systémique induite) qui est plutôt déclenchée par des micro-organismes spécifiques non pathogènes (Truman et al., 2007 ; Van der Ent et al., 2009). Ces deux types de résistances sont peu spécifiques car elles offrent une protection à la plante indépendamment de la nature de l'agent pathogène.

La SAR

La SAR conduit à la protection systémique de la plante vis-à-vis de nouvelles infections. Il s'agit d'un ensemble de signaux qui déclenchent des mécanismes de défense systémiques qui rendent les parties saines de la plante plus apte à freiner la progression de l'agent pathogène (Ross, 1961). Ainsi, la plante présentera une résistance de longue durée (plusieurs semaines) lors d'une deuxième infection. Une activation locale de la PTI ou ETI entraîne le déclenchement de la SAR. Généralement, ce type de résistance est caractérisé par une forte accumulation de l'AS et de protéines PR. La synthèse de PR1 est souvent utilisée comme un marqueur de la SAR (Ryals et al. 1996; Van Loon et al., 2006). Chez la vigne, l'inoculation de *P. viticola* au niveau de quelques feuilles induit l'expression d'une chitinase dans les jeunes feuilles non inoculées (Busam et al., 1997). L'importance de l'AS dans la SAR a été démontrée en utilisant des plants transgéniques *NahG* (intégration d'un gène codant pour une enzyme bactérienne qui dégrade la SA), ces végétaux sont alors plus sensibles à une seconde attaque par des agents pathogènes (Delaney et al., 1994 ; Kachroo et al., 2000).

Lors de l'initiation de la SAR au niveau des tissus sains, la mise en place d'une cascade de signaux semble être cruciale. Vernooij et al. (1994) ont montré que l'AS n'est pas le signal mobile de la SAR. Plusieurs études génétiques et biochimiques ont découvert plusieurs métabolites impliqués dans le signal à longue distance de la SAR comme le méthyl ester de SA (MeSA), le diterpénoïde dehydroabietinal (DA), un glycérol-3-phosphate (G3P), l'acide azelaïque (AZA) et l'acide pipécolique. Dans les tissus sains, l'initiation de la SAR

nécessite l'activation du Flavin-dependent Monooxygenase (FMOA) qui traduit ou amplifie les signaux originaires des tissus infectés (Mishina et Zeier, 2006).

L'accumulation de l'AS entraîne l'activation d'une protéine qui régule le statut redox (Non-expressor of PR genes 1, NPR1). Cette protéine interagit avec des facteurs de transcription dans le noyau, aboutissant à l'expression de gènes codant pour des protéines PR. Le Henanff et al. (2011) ont montré que les plants de vigne surexprimant NPR1 présentent une résistance accrue à l'oïdium.

Dans le modèle décrit par Van Loon et al. (2006) (figure 12), L'AS est décrit comme la molécule de signalisation impliquée dans la SAR, tandis que l'AJ et l'ET sont impliqués dans l'ISR. D'autres modèles existent et Pieterse et Van Loon (2007) et Van der Ent et al. (2009) ont montré que ces phytohormones peuvent être impliquées dans les deux types de résistance.

L'ISR

L'ISR est un état amélioré de la capacité de défense de la plante permettant de mobiliser les réponses de défenses appropriées avant ou lors de l'attaque du pathogène (Bakker et al., 2007). Cette résistance est déclenchée par des microorganismes non pathogènes et plus particulièrement par des bactéries de type PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Van Loon et al., 2005). Verhagen et al. (2010) ont montré que la présence de *Pseudomonas* spp. au niveau des racines de plants de vigne induit la production de FAO et de trans-resveratrol dans les feuilles qui présentent, par conséquent, une résistance à *B. cinerea*. L'effet protecteur conféré par la SAR est phénotypiquement similaire à l'ISR. Cependant, les mécanismes impliqués ainsi que les voies d'inductions de ces deux types de résistances semblent être différents. On peut mentionner que pour déclencher l'ISR, le nombre de PGPR au niveau racinaire doit atteindre un niveau suffisant, chez *Pseudomonas* par exemple, il doit être d'au minimum 10^5 cellules bactériennes par gramme de racines (Raaijmakers et al., 1995). Les mécanismes de résistance de l'ISR atteignent leur efficacité maximale 4 à 5 jours après application du micro-organisme non pathogène.

Certaines études menées sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* ont mis en évidence les rôles essentiels de l'ET et du facteur de transcription R2R3-type MYB, au niveau racinaire, pour l'initiation de l'ISR (Knoester et al., 1999; Verhagen et al., 2004) (figure 12). En effet, les plants mutants d'*A. thaliana eir1* (insensibles à l'ET au niveau racinaire

seulement), n'expriment pas l'ISR. De plus, suite à l'application d'une PGPR ou de *Trichoderma* sp., une surexpression du gène MYB72 codant pour le facteur de transcription R2R3-type MYB a été observée, au niveau de l'épiderme et des cellules corticales des racines (Alizadeh et al., 2013 ; Brotman et al., 2013 ; Sun, 2011). Les voies de signalisation de l'ET et de l'AJ ont un rôle essentiel dans la mise en place de l'ISR. Par exemple, l'ISR induite par *P. fluorescens* WCS417r ne s'exprime pas chez les mutants *ein2*, *jar1*, *jin1*, *eds8* et *coi1* (Knoester et al., 1999 ; Pieterse et al., 1998 ; Pozo et al., 2008). En outre, les PGPR sont plus efficaces contre les agents pathogènes qui sont sensibles aux mécanismes de défenses ET/AJ dépendants, comme les pathogènes nécrotrophes et les insectes herbivores (Pineda et al., 2010 ; Van Wees et al., 2008).

Bien que la majorité des études mettent en évidence l'importance des voies de signalisation dépendantes de l'AJ et de l'ET dans l'ISR, certaines études ont rapporté que l'AS est aussi impliqué dans ce type de résistance. Par exemple, un mutant de *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 qui produit de l'AS induit une protection chez le haricot et la tomate. Par contre, cette protection n'est pas observée dans le cas des tomates NahG qui sont incapables d'accumuler l'AS (Audenaert et al., 2002 ; De Meyer et al., 1999). Rudrappa et al. (2008) ont montré que *Bacillus subtilis* FB17 induit une résistance contre *Pseudomonas syringae* pv *tomato* via une accumulation de SA et l'induction de l'expression de protéine PR-1.

La protéine NPR1 semble aussi intervenir dans l'ISR (figure 12), par contre son rôle est différent chez la SAR. Elle est en effet responsable de l'activation de protéines PR dans la SAR ce qui n'est pas le cas dans l'ISR. Autre point de divergence, la cible de la NPR1 est nucléaire chez la SAR, tandis qu'elle est cytosolique chez l'ISR (Pieterse et Van Loon, 2007 ; Van der Ent et al., 2009).

La potentialisation (Priming)

La potentialisation ou « priming » est un état physiologique qui permet à la plante d'induire rapidement et/ou plus intensément ses mécanismes de défenses lorsqu'elle est soumise à un stress biotique ou abiotique (Conrath et al., 2002 ; 2006). Le priming peut être observé chez la SAR et l'ISR. Par exemple, chez le soja pré-traité par l'AS, l'induction de gènes de défense, le burst oxydatif et la mort cellulaire sont plus intenses en réponse à *P. syringae* pv. *glycinea* (Shirasu et al., 1997). Concernant l'ISR, Verhagen et al. (2010) ont démontré que le traitement de vitroplants de vigne par des rhizobactéries, *P. fluorescens* CHA0 ou *P. aeruginosa* 7NSK2, ou leurs extraits cellulaires, potentialise les feuilles pour une

production accélérée de phytoalexines, *i.e* resveratrol et viniferin, consécutivement à une attaque par *B. cinerea*. Le traitement de plants d'*A. thaliana* par *P. fluorescens* souche WCS417r induit l'activation des voies des AJ et ET ce qui va entraîner la potentialisation de l'expression de plusieurs gènes de défense (Verhagen et al., 2004). L'activation des voies de signalisation (ET et AJ) serait due à une augmentation de la sensibilité de la plante aux hormones et non pas à une augmentation de leur biosynthèse (Pieterse et al., 2000 ; 2014)

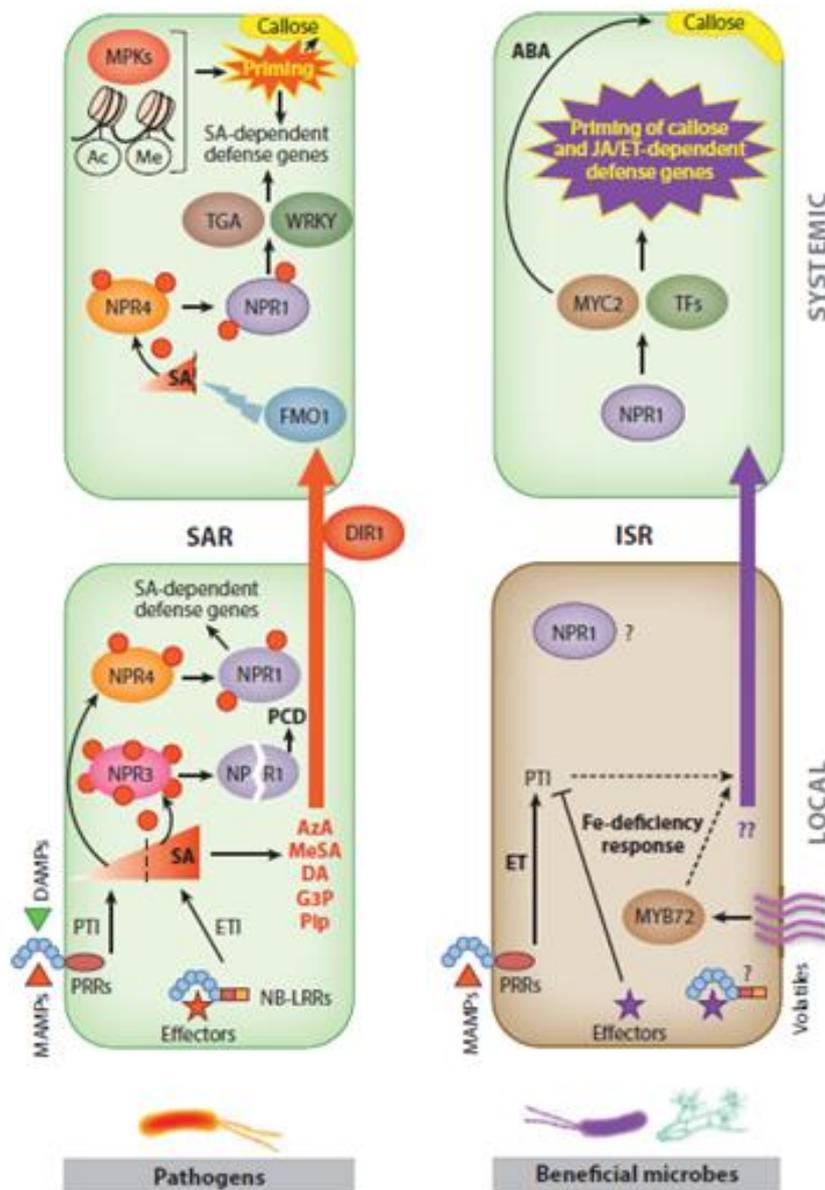


Figure 12 : Les mécanismes impliqués dans la SAR et l'ISR (Pieterse et al., 2014)

Objectifs et démarche

Objectifs

Dans la partie « synthèse bibliographique », la problématique associée aux maladies du bois de la vigne a été décrite ainsi que l'intérêt qu'apporterait le biocontrôle pour prévenir et lutter contre ces dépérissements. Un programme de recherche développé actuellement à l'UMR SAVE consiste à utiliser l'oomycète *P. oligandrum* pour protéger les ceps contre l'esca. Des souches de *P. oligandrum* ont d'abord été isolées à partir de racines de vignes prélevées dans plusieurs vignobles bordelais ayant des sols différents et caractérisées génétiquement (Gerbore et al., 2014b). Par la suite, la capacité de certaines souches à induire une résistance contre un champignon pathogène, *P. chlamydospora*, pionnier dans le développement de l'esca a été initiée.

Dans la présente thèse, l'objectif a tout d'abord été d'approfondir cette dernière partie en utilisant différentes combinaisons de souches de *P. oligandrum*, puis d'évaluer la protection apportée contre *P. chlamydospora* sur de jeunes plants de vigne. Les réponses émises par un ensemble de 22 gènes de défense de *V. vinifera* a d'abord permis de connaître la réponse de l'hôte lors de cette triple interaction, puis elle a été plus précisément décrite par des approches de microarray utilisant le génome de la vigne et RNA seq. Des observations en microscopie confocale à balayage laser (MCBL) ont permis de visualiser certaines réactions de défense émises lors de cette interaction.

Une approche originale et, à notre connaissance jamais utilisée dans les expérimentations sur le biocontrôle, a consisté à décrire l'intérêt de ce mode de protection chez des vignes greffées. Cette partie est en effet primordiale car 85% du vignoble mondial est greffé. Tout d'abord, l'aptitude de l'oomycète à coloniser les racines de différents porte-greffes et son influence sur la microflore indigène (champignons et bactéries) ont été évaluées. Puis l'analyse des réponses transcriptomiques de ces plantes, colonisées par *P. oligandrum* au niveau des racines du porte-greffe, et infectées par *P. chlamydospora* au niveau du greffon, a été effectuée.

Démarche scientifique

Afin d'atteindre les objectifs cités ci-avant, plusieurs actions ont été réalisées et seront présentées dans 2 chapitres de résultats, le premier consiste à utiliser des jeunes plants pieds-francs et le second des plants greffés. Ces 2 chapitres sont divisés en sous-parties, chacune correspondant à une expérimentation spécifique.

Dans le premier chapitre, la première action a d'abord consisté à déterminer par HPLC, à partir des filtrats de culture de l'oomycète, la production d'oligandrine (protéine stimulant les défenses de la plante) émise par des souches de *P. oligandrum*. Celles produisant des quantités importantes de cette molécule élicitrice ont été sélectionnées, combinées 2 à 2, et leurs potentiels pour protéger des boutures de Cabernet Sauvignon contre *P. chlamydospora* évalués. Trois inocula ont été choisis, les réactions de défenses de boutures de Cabernet-Sauvignon ont été caractérisées au niveau moléculaire par RT-qPCR lors de 3 essais de protection (1 essai/inoculum de *P. oligandrum*) contre *P. chlamydospora*. Les réponses d'une série de 22 gènes impliqués dans les mécanismes de défenses de *V. vinifera* ont été mesurées (Dufour et al., 2013).

La seconde action, a permis de décrire les réponses transcriptomiques globales de la vigne et de l'agent pathogène *P. chlamydospora* lors de l'interaction tripartite *V. vinifera* / *P. oligandrum* / *P. chlamydospora*. Les techniques moléculaires à haut débit employées, *i.e.* microarrays et RNAseq, permettent d'analyser finement les niveaux d'expression des diverses voies métaboliques induites ou réprimées chez le végétal. Le récent séquençage du génome de *P. chlamydospora* va aussi ouvrir de nouvelles perspectives pour connaître les réponses transcriptomiques spécifiques de l'agent pathogène, au niveau du tronc, par RNAseq. Ces technologies nécessitent des analyses bioinformatiques et statistiques pour le traitement des données obtenues.

La troisième action a consisté à observer par microscopie confocale à balayage laser certaines réactions de défense, *e.g.* la formation de tyloses et de composés fluorescents comme les phénols, émises lors de l'interaction tripartite décrite ci-avant.

Dans le second chapitre de résultats, dédiés aux plants de vigne greffés, une première partie a permis de vérifier que *P. oligandrum* peut coloniser dans le temps les systèmes racinaires de différents porte-greffes. Différentes combinaisons porte-greffes/greffons ont été réalisées et certains porte-greffes et cépages parmi les plus communs au vignoble ont été

utilisés. La colonisation racinaire par l'oomycète a été évaluée par méthode culturale pasteurienne et par PCRq. Suite à l'introduction de quantités importantes de *P. oligandrum* dans la rhizosphère, des bouleversements profonds et durables, au niveau des communautés microbiennes indigènes colonisant la plante, ont été recherchés. Afin d'étudier ce point, l'influence de *P. oligandrum* sur les communautés fongiques et bactériennes indigènes colonisant la rhizosphère (effet direct), mais aussi les feuilles (effet indirect), a été évaluée par une méthode d'empreinte moléculaire, la Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP).

Dans une seconde partie, la protection induite par *P. oligandrum* chez une combinaison spécifique porte-greffe/greffon a été appréhendée en analysant les réponses transcriptomiques globales au niveau des feuilles. Le but ici a été de rechercher des marqueurs génétiques foliaires qui permettent de mettre en évidence chez la plante un état de résistance contre un agent pionnier de l'esca, *P. chlamydospora*.

Chapitre I

Interaction *Pythium oligandrum*,
Phaeomoniella chlamydospora et vigne : étude
de l'induction de résistance chez des plants
pied-francs

Introduction

L'oomycète *Pythium oligandrum* est un micro-organisme tellurique, capable de coloniser la rhizosphère d'un grand nombre de plantes cultivées. Son efficacité en tant qu'agent de biocontrôle a été mise en évidence sur diverses cultures, telles que la tomate (Hase et al., 2008 ; Le Floch et al., 2003a ; 2005; Vallance et al., 2009), la pomme de terre (Ikeda et al., 2011), la betterave (Martin and Hancock, 1987 ; Takenaka et al., 2003), le blé (Takenaka et al., 2003) et la vigne (Gerbore et al., 2014b; Mohamed et al., 2007). Outre sa capacité à stimuler la croissance racinaire *via* la biosynthèse de tryptamine, un précurseur de l'auxine, à partir du tryptophane (Benhamou et al., 2012; Le Floch et al., 2003b) et d'être un compétiteur pour les sources carbonées ; *P. oligandrum* est capable de pénétrer rapidement à l'intérieur des tissus racinaires des plants, puis 12 heures après le début de cette colonisation, ses hyphes commencent à dépérir et meurent, ceci sans que la plante n'émettent de fortes réactions de défense (Le Floch et al., 2005). Suite à cette relation atypique, la plante développera une résistance contre plusieurs agents pathogènes (Le Floch et al., 2009). Cette résistance est induite, au moins en partie, par un ensemble de molécules appelées elicitin-like ou Microbe-Associated Molecular Patterns (MAMPs), qui stimulent le métabolisme secondaire ou la synthèse de divers composés structuraux à la base des mécanismes de défense de la plante. Cette stimulation a été observée chez la tomate (Le Floch et al., 2009) et la vigne (Gerbore et al., 2014b; Mohamed et al., 2007). Les principales molécules elicitin-like sont l'oligandrine (Benhamou et al., 2001; Picard et al., 2000b) et les Cell Wall Proteins (CWPs) (Masunaka et al., 2009 ; Takenaka et al., 2003 ; 2011). Les gènes codants ces molécules ne se trouvent que chez l'espèce *P. oligandrum* (Benhamou et al., 2012).

La caractérisation génétique des différentes souches de *P. oligandrum* isolées à partir de racines de vigne a montré qu'elles possèdent toutes au moins deux gènes, un codant pour l'oligandrine et un autre pour les CWPs (Gerbore et al., 2014b). La résistance locale induite au niveau des racines suite à l'introduction de *P. oligandrum* dans la rhizosphère (Benhamou et al., 1997) peut devenir systémique comme cela a été montré par Benhamou et al. (2001) et Le Floch et al. (2003b). Dans cette dernière étude, il avait été rapporté que cette résistance était associée à une production accrue de protéines PR, uniquement lorsque les plants de tomates pré-traités par *P. oligandrum* étaient infectés par *Botrytis cinerea*.

Compte tenu des propriétés de *P. oligandrum*, il nous a paru intéressant d'évaluer la capacité de cet oomycète à protéger les plants de vigne contre *Phaeomoniella chlamydospora*, un champignon pathogène impliqué dans l'esca, et de déterminer quels mécanismes étaient mis en jeu lors de cette interaction. *P. chlamydospora* a été choisi dans notre étude, car il est impliqué dans les premiers stades de développement des nécroses typiques de l'esca (Comont et al., 2010 ; Larignon, 2004 ; Martin et al., 2012) et c'est un champignon capable de former des lésions importantes au niveau du bois (Halleen et al., 2007 ; Laveau et al., 2009)

Lors de cette étude, un premier objectif a d'abord consisté à déterminer quelle était l'aptitude de plusieurs souches de *P. oligandrum*, précédemment isolées du vignoble, à produire l'oligandrine. Les souches excrétant des quantités importantes de cette molécule élicitrice ont été sélectionnées et leurs potentialités à protéger la vigne contre *P. chlamydospora* ont été testées. Les réactions de défenses de la plante ont été caractérisées au niveau moléculaire par RT-qPCR, à partir des échantillons prélevés lors de 3 essais de protection, réalisés avec des boutures de Cabernet Sauvignon, contre *P. chlamydospora*. Une série de 22 gènes impliqués dans les mécanismes de défenses de la vigne a été utilisée afin de déterminer le mode d'action de *P. oligandrum* (Dufour et al., 2013) lorsqu'il induit une résistance chez les plants attaqués par *P. chlamydospora*. Cette partie sera présentée sous forme d'une publication intitulée : « Ability of *Pythium oligandrum* strains to protect *Vitis vinifera* L., by inducing plant resistance against *Phaeomoniella chlamydospora*, a pathogen involved in esca, a grapevine trunk disease » qui paraîtra en 2016 dans la revue *Biological Control*.

Afin de développer des gènes marqueurs de la protection spécifique à cette interaction, l'analyse globale des réponses de la vigne, e.g. la régulation des voies de signalisation moléculaire, a été réalisée par microarray et RNAseq. L'effet indirect de *P. oligandrum* sur l'agent pathogène *P. chlamydospora* sera également déterminé. Cette partie sera aussi présentée sous la forme d'une publication (en préparation) qui est intitulée « High-throughput transcriptional analyses of a tri-partite interaction between an oomycete biocontrol agent, *Pythium oligandrum*, a pathogen, *Phaeomoniella chlamydospora*, involved in esca, a Grapevine Trunk Disease, and *Vitis vinifera* L. ». La dernière partie de ce chapitre a été dédiée à l'étude de l'interaction tripartite *P. oligandrum* / vigne / *P. chlamydospora* par microscopie confocale.

Partie I.1

Publication n°2

“Ability of *Pythium oligandrum* strains to protect *Vitis vinifera* L., by inducing plant resistance against *Phaeomoniella chlamydospora*, a pathogen involved in esca, a grapevine trunk disease”

Biological Control 92 (2016) 7–16



Ability of *Pythium oligandrum* strains to protect *Vitis vinifera* L., by inducing plant resistance against *Phaeoconiella chlamydospora*, a pathogen involved in Esca, a grapevine trunk disease



A. Yacoub^{a,b,c}, J. Gerbore^d, N. Magnin^{a,b}, P. Chambon^d, M.-C. Dufour^{a,b}, M.-F. Corio-Costet^{a,b}, R. Guyoneaud^c, P. Rey^{b,a,*}

^a INRA, ISVV, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE), F-33140 Villenave d'Ornon, France

^b Université de Bordeaux, ISVV, UMR1065 SAVE, Bordeaux Sciences Agro, F-33140 Villenave d'Ornon, France

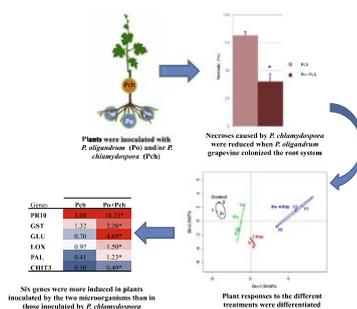
^c UMR CNRS 5254/IPREM-EEM, IBEAS, Université de Pau et des Pays de l'Adour, 64013 Pau, France

^d BIOVITIS, 15400 Saint Etienne de Chomeil, France

HIGHLIGHTS

- *P. oligandrum* inocula colonized the rhizosphere throughout the experimental period.
- Plant root system colonization by *P. oligandrum* reduced *P. chlamydospora* necroses.
- Plant molecular responses differed according to treatments.
- *P. oligandrum* enhanced certain gene expression in *P. chlamydospora* infected plants.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 July 2015

Revised 25 August 2015

Accepted 27 August 2015

Available online 29 August 2015

Keywords:

Grapevine trunk disease

Phaeoconiella chlamydospora

Pythium oligandrum

Oomycete

Induction of resistance

Wood necrosis

ABSTRACT

Biological control of *Phaeoconiella chlamydospora*, a pathogen involved in Esca, a grapevine trunk wood disease, was performed using the oomycete, *Pythium oligandrum*. Three 4-month greenhouse assays showed that necrosis of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon cuttings caused by *P. chlamydospora* was significantly reduced (40–50%) when *P. oligandrum* colonized the plant root systems. The expression of a set of 22 grapevine defense genes was then quantified by real-time polymerase chain reaction to determine plant responses in the interaction between *P. oligandrum*/*V. vinifera* L./*P. chlamydospora*. In the trunk, specific grapevine responses to the different treatments (control, *P. oligandrum*, *P. chlamydospora* and *P. oligandrum* + *P. chlamydospora* treatments) were significantly differentiated. Expression levels of 6 genes associated with *P. chlamydospora* infection showed higher induction than when plants were pre-treated with *P. oligandrum*. These genes are involved in various pathways (PR proteins, phenylpropanoid pathways, oxylipin and oxydo-reduction systems).

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

* Corresponding author at: INRA, ISVV, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE), F-33140 Villenave d'Ornon, France.

E-mail address: prey@bordeaux.inra.fr (P. Rey).

1. Introduction

Over the last two decades, grapevine trunk diseases (GTDs) such as Esca, Eutypiosis and Botryosphaeria diebacks, have become a subject of major concern for the wine industry worldwide (Abero et al., 2011; Ammad et al., 2014; Bertsch et al., 2013; Chebil

et al., 2012; Correia et al., 2013; Diaz et al., 2012; Kaliternam and Milicevic, 2013; Mohammadi et al., 2013; Mondello et al., 2013; Rego et al., 2000; Urbez-Torres et al., 2009, 2012; Yan et al., 2011). In France, Grosman and Doublet (2012) reported that, in 2008, about 11% of French vineyards were unproductive, a figure that had increased to 13% in 2012. Moreover, Bruez et al. (2013) reported that in certain regions, such as Charentes or Jura, the proportion of unproductive grapevines due to GTDs affected plants in a vineyard reached 32.6% or 18.42%, respectively. Besides causing losses in grapevine yield, GTDs may also have a non-negligible effect on wines. Lorrain et al. (2012) reported a detectable loss of wine sensory quality, when only 5% of the grapes used to produce the wine were affected by Esca. Because Esca is the most frequent GTD in Europe, experiments have generally been focused on this disease. Esca is commonly thought to result from the pathogenic activity of fungal species, including *Phaeoconiella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai) Crous & W. Gams (Chaetothiales: Herpotrichiellaceae), *Phaeoacremonium aleophilum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai (Diaporthales: Togniniaceae) and *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch. (Hymenochaetales: Hymenochaetaceae). However, *Eutypa lata* (Pers.) Tul. & C. Tul. (Xylariales: Diatriypaceae), *Stereum hirsutum* (Willd.) (Russulales: Stereaceae) and Botryosphaeriaceae species may also be involved in Esca (Bertsch et al., 2013). These fungi deconstruct the wood, causing various types of necroses: central necrosis, black punctuate necrosis, sectorial necrosis and a necrosis called white rot, or “amadou”, typically associated with Esca (Maher et al., 2012). Attacks generally end in grapevine death a few years later (Guérin-Dubrana et al., 2013) but one form, apoplexy, is particularly severe, resulting in plant death within a few days only (Larignon et al., 2009).

Ever since the ban in 2001 on the use of sodium arsenate, the only pesticide registered to control GTDs, the use of alternative methods, such as biocontrol, has become essential. Various microorganisms have been tested to control the fungi involved in Esca. In the vineyard, treating fresh pruning wounds with *Trichoderma atroviride* P. Karst (Hypocreales: Hypocreaceae) strain USPP-T1 reduced the incidence of *P. chlamydospora* by 77% (Kotze et al., 2001). The authors showed that *Bacillus subtilis* Ehrenberg (Bacillales: Bacillaceae) is less effective than *T. atroviride* USPP-T1 in protecting grapevine against *P. chlamydospora* attack. The same study reported that *T. atroviride* strains were more effective at reducing pruning wound infection, because they had originally been isolated from grapevine and were, therefore, probably more adapted to the grapevine wood environment. In nurseries, it was shown that vascular streaking induced by *P. chlamydospora* was significantly reduced in *Trichoderma harzianum* Pers. (Hypocreales: Hypocreaceae)-inoculated shoots (Di Marco et al., 2004; Fourie and Halleen, 2006). Alfonzo et al. (2009) reported that antagonistic substances produced by a *B. subtilis* strain (AG1) could inhibit mycelial growth of *P. chlamydospora* and *P. aleophilum*.

One oomycete, *Pythium oligandrum* Dreschler (Pythiales: Pythiaceae), which naturally colonizes the rhizosphere of many plants, including grapevine (Gerbore et al., 2014), was assessed for the control of *P. chlamydospora*, a fungus involved in Esca. This oomycete was chosen for several reasons: (i) the interaction between pathogens/plants/*P. oligandrum* has already been described in numerous cases (Le Floch et al., 2005, 2009; Takenaka et al., 2003); (ii) *P. oligandrum* has several biocontrol agent properties that play an important role in the reduction of disease incidence. This oomycete can interact directly with the pathogens through mycoparasitism (Benhamou et al., 1997, 1999), antibiosis (Bradshaw-Smith et al., 1991; Benhamou et al., 1999), competition for nutrients (Martin and Hancock, 1987) or, indirectly, via the stimulation of plant defenses (Benhamou et al., 1997; Le Floch et al., 2003; Lherminier et al., 2003; Masunaka et al., 2010;

Mohamed et al., 2007; Picard et al., 2000; Takenaka et al., 2003, 2006, 2008). *P. oligandrum* can reduce pathogenic attacks on many plants; this reduction varies from 15% to 100% (Gerbore et al., 2013). Among all its various direct and indirect modes of action, the stimulation of plant defenses and resistance has been the most frequently studied effect of *P. oligandrum* (Benhamou et al., 2012; Gerbore et al., 2013; Rey et al., 2008).

P. oligandrum produces three protein elicitors: oligandrin, POD-1 and POD-2, which activate the plant defense systems. Picard et al. (2000) have shown that *P. oligandrum* produces an elicitor-like protein with a molecular mass of 10 kDa, which is called oligandrin. This molecule induced resistance in tomato in order to control *Phytophthora parasitica* Breda de Haan (Peronosporales: Peronosporaceae). Mohamed et al. (2007) reported that when *Botrytis cinerea* Pers. (Helotiales: Sclerotiniaceae) was applied to leaves of oligandrin-pretreated plants, leaf invasion was limited and the protection level reached about 75%. On the other hand, Takenaka et al. (2003) extracted an elicitor from the cell wall protein fraction of *P. oligandrum* that contained two major proteins, POD-1 and POD-2. Foliar treatment of sugar beet, using cell wall protein fractions from *P. oligandrum*, induced defense-related genes, which were more rapidly expressed in cell wall protein-treated leaves than in control leaves treated with distilled water (Takenaka and Tamagake, 2009).

In the present study, the ability of various strains of *P. oligandrum*, whether isolated or not from the rhizosphere of grapevine to colonize and protect vine against *P. chlamydospora* was assessed. Accordingly, we determined whether *P. oligandrum* was able to reduce the symptoms, i.e. wood necrosis, caused by *P. chlamydospora*. The induced resistance in plants was then examined at trunk level (wood tissues) using a set of 22 genes involved in grapevine defenses as defined by Dufour et al. (2013).

2. Materials and methods

2.1. *oligandrum* strains

Three different inocula of *P. oligandrum* (Po1, Po2 and Po3) were evaluated. Each inoculum was a mixture of two strains: Po1 (Oth-2 and Oth-3), Po2 (Sto-1 and Oth-4) and Po3 (Sto-7 and Sto-11). Inocula (oospores-mycelium homogenate) were prepared by Biovitis (Saint Etienne Chomeil, France) and the concentration for each inoculum was adjusted to 2×10^4 oospores per mL.

The six different strains of *P. oligandrum* used in this study (Table 1) had already been genetically characterized by sequencing the Elicitor-like protein genes, i.e. genes that code for oligandrin (Oli-D1 or Oli-S1) and cell wall proteins (POD1-a, POD-1, POS-1) (Gerbore et al., 2014). Each strain had one gene encoding oligandrin and one gene encoding cell wall proteins. In this study, the amounts of oligandrin produced by each strain were evaluated using HPLC, as described by Gerbore et al. (2014).

Table 1

Elicitor genes (oligandrin and cell wall protein genes) and oligandrin production of *Pythium oligandrum* strains used in the 3 trials. At least 2 repetitions per strain were performed. Means values with different letters are significantly different at $P < 0.05$ (ANOVA and Tukey).

Strain	Inoculum	Oligandrin (mg/L) (\pm SE)	Cell wall protein genes	Oligandrin genes
Oth-2	Po1	61.08 \pm 6.68ab	POD1-a	Oli-D1
Oth-3	Po1	100.07 \pm 21.13b	POD-1	Oli-D1
Sto-1	Po2	81.10 \pm 5.39ab	POD-1	Oli-D1
Oth-4	Po2	63.92 \pm 6.49ab	POS-1	Oli-S1
Sto-7	Po3	77.66 \pm 6.12a	POD-1	Oli-D1
Sto-11	Po3	65.85 \pm 7.77ab	POS-1	Oli-S1

2.2. *chlamydospora* strain

P. chlamydospora strain SO37 (INRA-UMR SAVE collection, Bordeaux, France) was grown on malt agar medium at 25 °C in the dark. This strain is well known for its virulence and ability to induce necrosis in the wood (Laveau et al., 2009). The infection was performed using a 7-week-old culture of *P. chlamydospora*. The same strain of *P. chlamydospora* was used in all experiments.

2.3. Plant culture

For each experiment, grapevine plants (*V. vinifera* L. cv. Cabernet-Sauvignon) were propagated from 2-node wood cuttings in a greenhouse. The cuttings were rooted 2 months before infection and grown under controlled conditions. The temperature was maintained between 22 and 28 °C. Plants were watered for 2 min per day, via a drip system (2 l/h) and fertilized twice a week (nutrient solution N/P/K 20/20/20). On average, they received 16 h of light per day.

2.4. Experimental design

Three similar independent experiments trials, A, B and C, were carried out. The experimental design was conducted in a randomized complete block design with 9 plants per treatment for root and wood samplings, and 30 plants per treatment for necrosis assessment. Experimental conditions consisted of cuttings (i) inoculated on roots, with *P. oligandrum* inocula; (ii) infected by the pathogenic agent *P. chlamydospora*, at trunk level; (iii) inoculated on roots with *P. oligandrum* and then, one week later, infected with *P. chlamydospora* at trunk level; (iv) control cuttings with a hole (in order to mimic the infection procedure) used to represent mock control and (v) control cuttings not inoculated by *P. oligandrum*, nor infected by *P. chlamydospora*. Inoculum Po1 was evaluated in trial A, Po2 was evaluated in trial B, and Po3 was assessed in trial C.

2.5. Oomycete and fungal treatments of plants

At 7–8 leaf stage, rooted cuttings were inoculated twice with *P. oligandrum*, at the collar level of each plant: once with 50 mL of inoculum and with an additional 40 mL, three days later.

In order to infect plants with *P. chlamydospora*, the stem of each cutting was surface-sterilized with 95% ethanol and artificially wounded by drilling a hole (2 mm in diameter, 5 mm deep), 2 cm below the upper bud. The hole was filled with a *P. chlamydospora* mycelium plug cut off from the margin of each fresh culture on malt agar. The inoculation site was then immediately covered with paraffin wax. Cuttings inoculated with malt agar plugs were used as mock control.

2.6. Wood sampling

Wood samples were collected at two sampling times: 0 day-post-inoculation (dpi) = 2 h post infection with *P. chlamydospora* and 14 dpi with *P. chlamydospora*. Nine plants per treatment (3 plants and 3 replications) were collected each time and, for each plant, a part of the stem, (2 cm above and 2 cm below the wound-inoculation hole) was sampled. All samples were immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C for subsequent transcriptomic analyses. At the end of the experiment (120 dpi), 30 plants per treatment were collected for disease evaluation necrosis measurement.

2.7. Assessment of grapevine root colonization by *P. oligandrum*

Root colonization by *P. oligandrum* was monitored during the experiments at three time point, 14, 56 and 120 dpi, using plate-counting method. At each sampling time, for each plant, 20 root fragments were randomly collected, deposited on a selective medium CMA-PARP (Corn Meal Agar added with Pimaricin, Ampicillin, Rifampicin and Pentachloronitrobenzene) (Jeffers and Martin, 1986), and incubated at 25 °C in the dark for 10 days. For each root fragment, the presence of typical *P. oligandrum* echinulated-oospores (thick-walled spiny oospores, van der Plaats-Niterink, 1981) was recorded by optical microscope observation. The average frequency of *P. oligandrum* oospores was determined for each treatment.

The effects of the fixed factors “treatments” (2 levels) and “sampling time points” (3 levels), and of their interaction on the binomial response variable “Frequency of *P. oligandrum* root colonization”, were tested with a two-way generalized linear model (GLM). As the interaction was significant ($P = 10^{-08}$), we then tested the effect of each factor alone, and when this effect was significant, we performed multiple comparison tests in order to determine whether the observed differences between treatments were significant. All the statistical analyses were done using software R. 3.1.1 and the library “multcomp” for analyses.

2.8. Assessment of plant protection induced by *P. oligandrum* against *P. chlamydospora* attack

At the end of each experiment, 120 dpi, 30 plants per treatment were collected. Then, the stem of each plant was sectioned longitudinally and the length of necrosis caused by *P. chlamydospora* was measured. The rate of necrosis was obtained by calculating the ratio between the length of necrosis and the total cutting length. Analysis of variance (ANOVA, R 3.1.2) was carried out to assess differences between treatments.

2.9. Plant total RNA extraction and reverse transcription

A fine powder was produced by grinding wood samples in liquid nitrogen, using a Tissue LyserII (Qiagen). For each treatment, 1.2 g of the three cuttings collected (400 mg per cutting) were weighed and combined into a “pool”, which means that three “pools” of 3 cuttings (corresponding to 3 replicates per treatment) were obtained. The commercial kit (Qiagen) “RNeasy Plant Mini Kit” was used in accordance with the manufacturer's instructions with some modifications. Briefly, for each sample, 100 mg of powder were used twice, and 1% β-mercapthoethanol and 3% PVP40 were added to the lysis buffer (RLT). After homogenization of the mixtures, 200 μL of chloroform, isoamyl alcohol (24:1, v/v), were added to each tube. Solutions coming from the same sample were then pooled and transferred to the same spin column. A DNase treatment was performed (On-Column DNase I Digestion Set, using the protocol proposed by the supplier (Sigma–Aldrich)). Precipitation step was then performed in order to enhance the quality of RNA obtained: 0.1 volume of sodium acetate and 3 volumes of ethanol (99%) were added to the extracted RNA. Samples were then placed overnight at –20 °C. After 30 min of centrifugation at maximum speed, pellets were washed twice, using ethanol 70% and 99.9%, respectively. RNA yield and purity were estimated using a Nanodrop (ND-1000, ThermoScientific).

Reverse transcriptase assay was conducted following the MIQE guidelines (Bustin et al., 2009). For each material, about 0.5 μg of total RNA was reverse-transcribed in a total volume of 20 μL with M-MLV reverse transcriptase (Promega) following the manufacturer's instructions. The cDNA obtained were stored at –20 °C.

2.10. Quantitative polymerase chain reaction

The expression level of the 22 genes involved in the grapevine defense system was quantified, using real-time quantitative PCR (Table 2). Nineteen of the 22 studied genes have already been described by Dufour and co-workers (2013): 7 genes encoding PR proteins (*Pr1*, *Glu*, *Chit3*, *Chit4*, *Pin*, *Pr10* and *Pgip*); 3 genes involved in anthranilate pathway (*Chors*, *Ants*, *Chorm*); 6 genes involved in secondary metabolites biosynthesis, phenylpropanoid pathway (*Pal*, *Sts*, *Chi*, *Chs*, *Ban* and *Ldox*); one is a gene involved in the oxido-reduction system (*Gst*); *Acc* and *Lox* are respectively involved in the ethylene or oxylipin pathways. Three genes involved in wall thickness enhancement (*Cals*, *Cagt* and *Per*) were also analyzed (Dufour, 2011). Elongation factor 1 isoform γ (*Ef1* γ , GenBank AF176496) and the gene for glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*, GenBank CB973647) (Reid et al., 2006) were used as housekeeping genes to calculate transcript relative gene expression (Table 2). CFX 96 system thermocycler (Bio Rad) with SYBR[®]Green was used to assess the expression of genes. RT-qPCR was carried out as described by Dufour et al. (2013). Briefly, each reaction was performed in duplicate, using 1 μ l of each primer at 1 μ M, and 7 μ l of 2 \times Blue SYBR Green fluorescein mix and 5 μ l of cDNAs. Relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Vandesompele et al., 2002). For each treatment, a fold change (FC) was obtained by calculating the relative gene expression between 0 and 14 dpi, and subsequently normalized by the relative gene expression between 0 dpi and 14 dpi of the corresponding control (mock control for *P. chlamydospora* and *P. oligandrum* + *P. chlamydospora* treatments or control for mock control and *P. oligandrum* treatments). The values of FCs between 0 and 1 correspond to repressions. The FCs obtained were studied by principal component analysis (PCA) with Analysis of variance (ANOVA, R 3.1.2) was carried out to assess differences between treatments.

Variables with $\cos^2 > 0.5$ on one of the first or second components (Dim1 or Dim2) were estimated as sufficiently well represented by the principal plan generated by this PCA.

Table 2
Genes involved in transcript profile analysis.

Family	Genes	Abbreviation
Housekeeping genes	Elongation factor 1- γ chain	<i>Ef1</i> γ
	Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase	<i>Gapdh</i>
PR-proteins	PR protein 1	<i>Pr1</i>
	PR protein 10	<i>Pr10</i>
	Chitinase class III	<i>Chit3</i>
	Chitinase class IV	<i>Chit4</i>
	Polygalacturonase inhibitor protein	<i>Pgip</i>
	β -1,3 glucanase	<i>Glu</i>
	Serine protease inhibitor	<i>Pin</i>
Phenylpropanoides	Phenylalanine ammonia lyase	<i>Pal</i>
	Stilbene synthase	<i>Sts</i>
	Chalcone isomerase	<i>Chi</i>
	Chalcone synthase	<i>Chs</i>
	Leucoanthocyanidin dioxygenase	<i>Ldox</i>
	Anthocyanidine reductase	<i>Ban</i>
Indoles	Antranilate synthase	<i>Ants</i>
	Chorismate mutase	<i>Chorm</i>
	Chorismate sythase	<i>Chors</i>
Wall thickness	Callose synthase	<i>Cals</i>
	Peroxidase	<i>Per</i>
	Coniferyl alcohol glucosyl transferase	<i>Cagt</i>
Others	Lipoxygenase 9	<i>Lox</i>
	Glutathione S-transferase	<i>Gst</i>
	1-Aminocyclopropane, 1-carboxylic acid oxidase	<i>Acc</i>

Expression levels of certain genes in plants treated by *P. oligandrum* and infected with *P. chlamydospora* were compared to plants infected with the pathogen only. A non-parametric test (Kruskal Wallis) was carried out to assess differences between treatments, using R 3.1.2).

3. Results

3.1. Oligandrin production by *P. oligandrum* strains

For the 6 *P. oligandrum* strains used in the study, the concentrations measured in the liquid medium by HPLC ranged from 61.08 mg L⁻¹ (strain Oth-2) to 100,07 mg L⁻¹ (strain Oth-3), and the average production was 74.94 mg L⁻¹ (Table 1). The means of oligandrin production per inoculum were 72.51, 80.995 and 71.75 mg L⁻¹ for Po1, Po2 and Po3, respectively. Oligandrin productions were significantly different between Sto7 (77.66 mg L⁻¹) and Oth-3 (100.07 mg L⁻¹) strains ($P < 0.05$).

3.2. Assessment of root colonization by *P. oligandrum*

P. oligandrum colonized the root systems of plants over the whole experimental period in the three trials (Fig. 1). *P. oligandrum* was not detected on non-inoculated plant roots. The lowest percentages of root colonization by the oomycete, obtained in experiment A, varied from 23% (14 dpi) to 6% (56 dpi) of the roots. In experiment B, 38% of roots at 14 dpi were colonized and 23% at 120 dpi. Higher values were obtained in experiment C, with root colonization percentages varying from 69% (14 dpi) to 32% (120 dpi). In all experiments, the percentage of root colonization by *P. oligandrum* was always significantly higher for plants inoculated by *P. chlamydospora* than for those inoculated exclusively by *P. oligandrum* at 120 dpi ($P < 0.05$).

Depending on the experiments and the treatments (roots inoculated exclusively with *P. oligandrum* vs *P. oligandrum* + *P. chlamydospora*), the percentage of root colonization by *P. oligandrum* (i) decreased over time, e.g. experiments A and B, for *P. oligandrum* treatment; (ii) increased over time, e.g. experiment B with both *P. oligandrum* and *P. chlamydospora* treatments; or (iii) stayed stable, e.g. experiment C for both *P. oligandrum* and *P. chlamydospora* treatments.

3.3. Protection of grapevine cuttings against *P. chlamydospora* attack

In order to test the resistance induced by *P. oligandrum* against *P. chlamydospora*, the length of necrosis in the grapevine wood was measured (Fig. 2). In the 3 experiments, plants treated at the root level by *P. oligandrum* displayed significant reduction in necrosis length compared with *P. oligandrum* non-inoculated plants ($P < 0.05$). Necroses caused in Cabernet Sauvignon cuttings by *P. chlamydospora* were estimated at around 80%. The necrosis reduction was estimated at 40% and 50% in experiments A and B, respectively, when the roots were colonized by *P. oligandrum*. In experiment C, necroses caused by the pathogen were about 50% and necrosis reduction was about 50% in plants inoculated by *P. oligandrum* at root level.

3.4. Assessment of grapevine-specific responses at trunk level by qRT-PCR

Plant response to the different treatments was evaluated in trunk at the transcriptional level by qRT-PCR, in the 3 trials. The expression level of 22 defense-related genes of grapevine was studied, and a PCA was performed to test possible separation between treatments according to their FCs (Fig. 3).

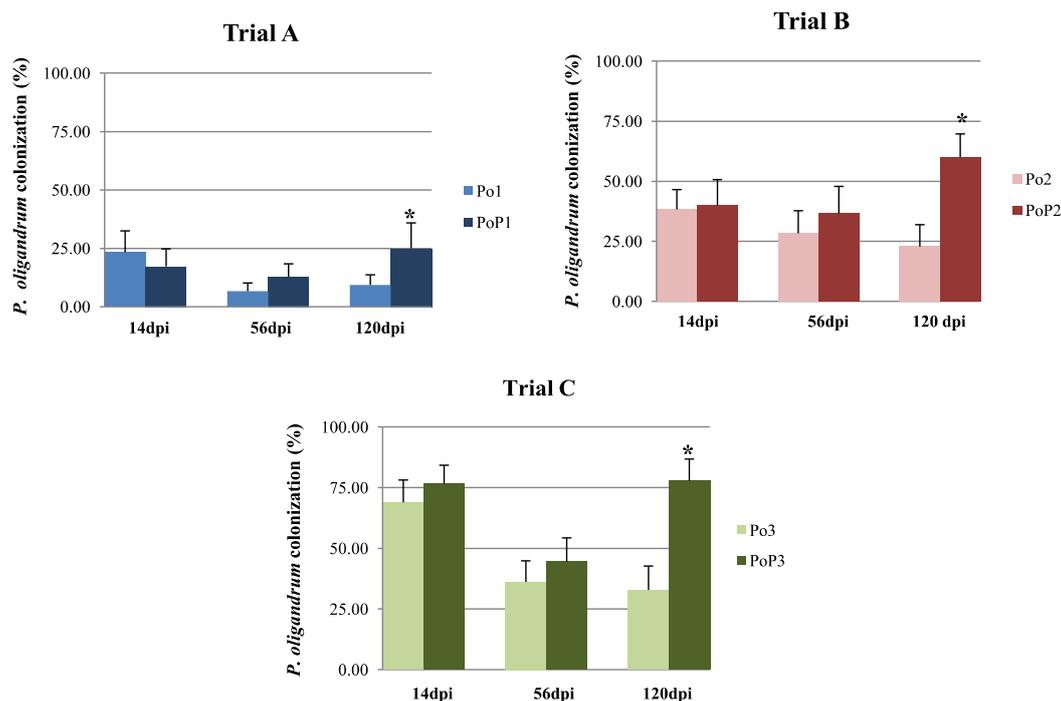


Fig. 1. Root colonization of vines by *P. oligandrum* assessed by plate counting in trials A, B and C. The values reported are means (\pm SE) of 9 samples collected in each treatment per sampling point. 14, 56 and 120 day-post-infection (dpi) with *P. chlamydospora* (*P. oligandrum* was inoculated 7 days before infection with the pathogen). Po1, Po2, and Po3 correspond to the 3 inocula of *P. oligandrum* (cf. Table 1), PoP1, PoP2 and PoP3: Po1 + *P. chlamydospora*, Po2 + *P. chlamydospora* and Po3 + *P. chlamydospora*. *Indicates means that are, within a trial, significantly different between the two treatments at $P < 0.05$ (generalized linear model).

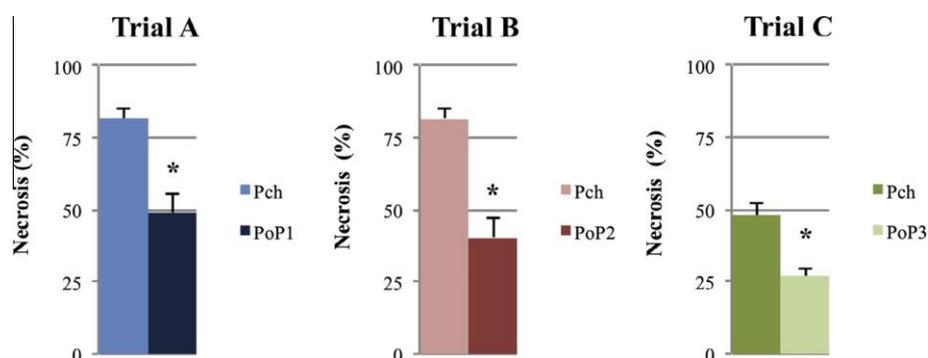


Fig. 2. Wood necrosis caused by *P. chlamydospora* in trunk cuttings treated or not with *P. oligandrum* at the root level, 120 days post infection. The values reported are means (\pm SE) of 30 samples collected in each treatment. Po1, Po2, and Po3 correspond to the 3 inocula of *P. oligandrum* (cf. Table 1), PoP1, PoP2 and PoP3: Po1 + *P. chlamydospora*, Po2 + *P. chlamydospora* and Po3 + *P. chlamydospora*, Pch: *P. chlamydospora*. *Indicates means that are, within a trial, significantly different between the two treatments at $P < 0.05$ (ANOVA).

For all trials A, B and C, PCA eigenvalues indicated that the first two principal components, Dim1 and Dim2, explained 68.92%, 75.11% and 70.01%, respectively, of total data variance. Results showed that grapevine responses differed significantly according to the treatment in the 3 trials.

Dim1, which represented 43.23%, 56.04% and 50.36%, respectively, in trials A, B and C, separated specific grapevine responses, *P. oligandrum* treatment and mock inoculation on one side, *P. chlamydospora* infection and *P. oligandrum* + *P. chlamydospora* treatment on the opposite side (A and B: negative vs positive coordinates; C: positive vs negative coordinates).

Dim2, which represented 25.69%, 19.07% and 21.34%, respectively, in trials A, B and C, separated grapevine responses to *P. chlamydospora* treatment and to mock inoculation (A and B: negative vs positive coordinates; C: positive vs negative coordinates).

In trials A and C, *P. oligandrum* treatment and mock inoculation were also separated by Dim2 (A: positive vs negative coordinates; C: negative vs positive coordinates).

In order to characterize the effect of each treatment on grapevine defense responses, correlation circles were studied (Fig. 4) for the different trials, A, B and C. Only well represented genes were analyzed. In trials A and B, the studied genes were separated by Dim1 into two groups (negative vs positive coordinates) (Fig. 4a and b). The first group was composed of 5 genes: *Chs*, *Ban* and *Ldox* (phenylpropanoid pathway), *Chorm* (anthranilate pathway) and *Per* (wall thickness enhancement). Expression of these genes were more associated with grapevine response to mock inoculation. The second group of 11 genes belonged to different families involved in grapevine defenses: *Pr1*, *Pr10*, *Chit3*, *Pin* and *Glu* (PR Proteins family), *Sts*, *Pal* and *Ants*

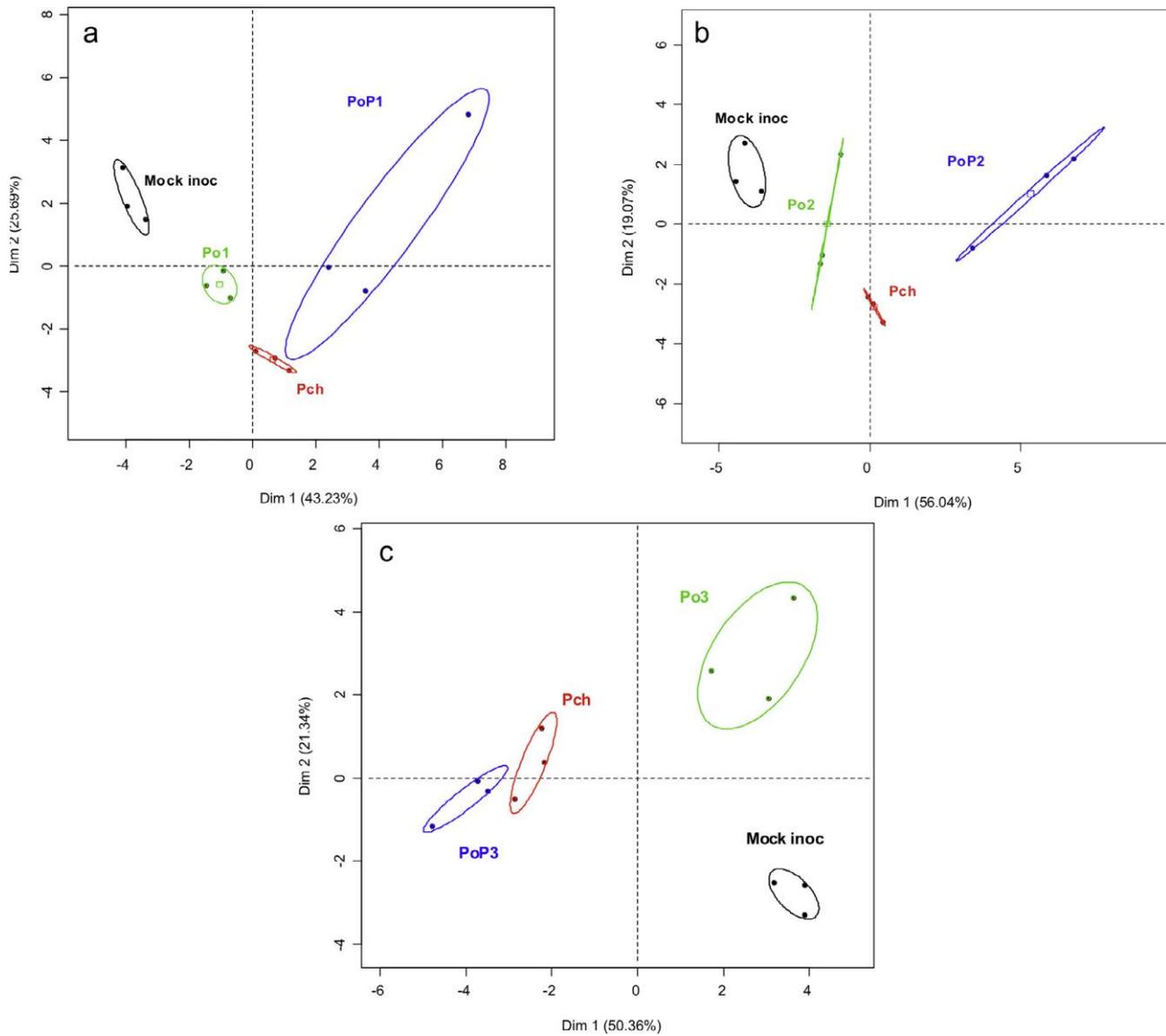


Fig. 3. Principal component analysis of specific plant responses (expression levels of 22 genes involved in plant defences) 14 days after pathogen infection at the trunk level: mock inoculation (black), *P. oligandrum* treatment (green), *P. chlamydospora* infection (red) and *P. oligandrum* + *P. chlamydospora* (blue). Ellipsoids represent the center of factors with 95% confidence. Po1, Po2, and Po3 correspond to the 3 inocula of *P. oligandrum* (cf. Table 1), PoP1, PoP2 and PoP3: Po1 + *P. chlamydospora*, Po2 + *P. chlamydospora* and Po3 + *P. chlamydospora*. Pch: *P. chlamydospora*. Mock inoc: mock inoculated. a, b and c for, respectively, trials A, B and C. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(phenylpropanoid pathway), *Lox* (oxylipin pathway) and *Gst* (oxido-reduction system). Their expressions were associated with grapevine responses to *P. chlamydospora* infection and *P. oligandrum* + *P. chlamydospora* treatment. According to the results obtained in Fig. 3a and b, the expression levels of this group of genes were higher in plants inoculated by the two microorganisms than in plants infected exclusively by the pathogenic agent.

For trial C, three groups of genes were differentiated (Fig. 4c). The first group contained genes encoding PR proteins (*Pgip*, *Chit3* and *Chit4*) and a gene involved in anthranilate pathway (*Ants*). The expression of these 4 genes was more associated with plant response to *P. oligandrum* treatment. Regarding plant response to mock inoculation, the expression of 8 genes was associated with: *Chi*, *Chs*, *Ldox* and *Ban* (phenylpropanoid pathway), *Chorm* (anthranilate pathway), *Pr1* and *Pr10* (PR Proteins) and *Cagt* (enhancing wall thickness). The genes of the third group had an

expression associated with plant response to *P. chlamydospora* and *P. oligandrum* + *P. chlamydospora*. This group was composed of 4 genes: *Pal*, *Sts* (phenylpropanoid pathway), *Glu* (PR proteins) and *Gst* (oxido-reduction system).

As shown in Table 3, in all trials, six genes were more induced in plants inoculated with *P. oligandrum* and infected with *P. chlamydospora* than in those infected with *P. chlamydospora* alone (except the *Pal* gene in trial C).

Five genes were up-regulated in presence of *P. oligandrum* in all trials (except for the *Pal* gene in trial C). Two of these genes belong to the PR protein family (*Pr10* and *Glu*); another two genes, *Gst* and *Lox*, are involved, respectively, in oxido-reduction system and oxylipin pathway. The fifth gene (*Pal*) is involved in phenylpropanoid pathways.

One gene, *Chit3* (PR protein family), was less repressed in plants inoculated with the two microorganisms than in those infected with the pathogen.

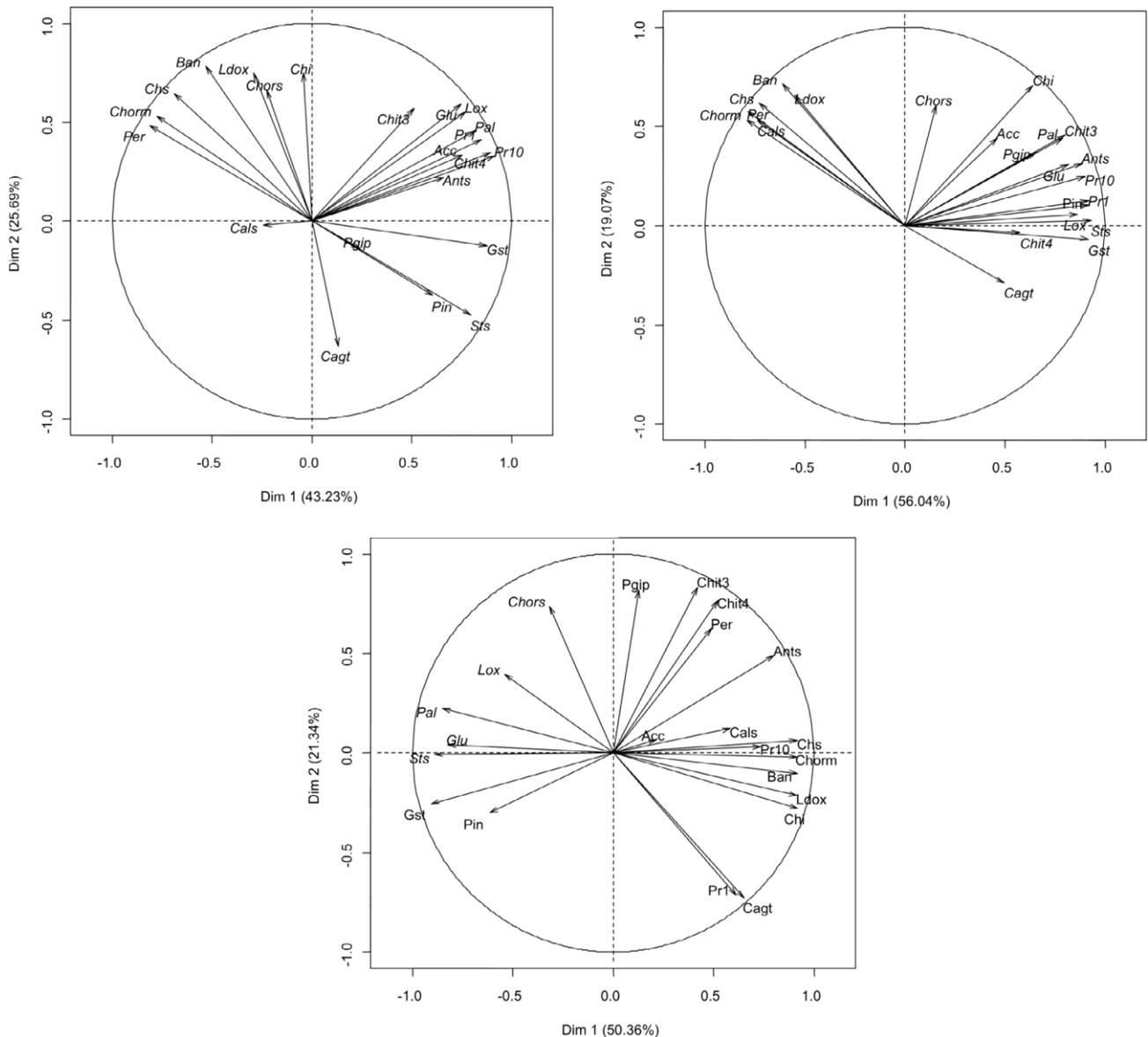


Fig. 4. Distribution into correlation circles of expression levels of 22 genes involved in plant defenses 14 days after infection with the pathogen. a, b and c for, respectively, trials A, B and C. Pr1: PR protein 1, Pr10: PR protein 10, Chit3: chitinase class III, Chit4: chitinase class IV, Pajp: polygalacturonase inhibitor protein, Glu: β -1,3 glucanase, Pin: serine protease inhibitor, Pal: phenylalanine ammonia lyase, Sts: stilbene synthase, Chi: chalcone isomerase, Chs: chalcone synthase, Ldox: leucoanthocyanidin dioxygenase, Ban: anthocyanidine reductase, Ants: antranilate synthase, Chorm: chorismate mutase, Chors: chorismate sythase, Cals: callose synthase, Per: peroxidase, Cagt: coniferyl alcohol glucosyl transferase, Lox: lipoxygenase 9, Gst: glutathione S-transferase, Acc: 1-aminocyclopropane, 1-carboxylic acid oxidase.

4. Discussion

One well-described mode of action of *P. oligandrum* or of its elicitors (oligandrin, cell wall proteins) is their ability to stimulate plant system defenses (Mohamed et al., 2007; Takenaka et al., 2006; Takenaka and Tamagake, 2009). Oligandrin production could therefore be an important criterion for selecting strains of this oomycete. In our study, all 6 strains used to protect grapevine against *P. chlamydozpora*, a pathogen involved in Esca, produced oligandrin. The quantities of oligandrin were relatively higher than those obtained by Picard et al. (2000). This result is in agreement with Gerbore et al. (2014) who showed that all these strains possess one gene encoding oligandrin, which suggests that production of oligandrin is a common trait among the *P. oligandrum* strains. In addition, each strain had also one gene encoding cell wall proteins, but these molecules are not secreted like oligandrin, they are

located in the cell wall of *P. oligandrum*. Taken together, all this information and data on *P. oligandrum* indicates that all these strains have a great potential to induce resistance in plants.

In order to protect grapevine against infection by *P. chlamydozpora*, it was shown that, for the 3 trials, *P. oligandrum* was always isolated in the rhizosphere during the 4-month experimental period. The same type of result was obtained by Le Floch et al. (2003) when they detected this oomycete on the roots of tomato grown in soilless culture 3 months after inoculation, using the same plate-counting method. They indicated that the highest level of *P. oligandrum* root colonization was detected 4 weeks after inoculation. In our study, the highest level of colonization was detected 21 days after *P. oligandrum* was inoculated on the grapevine roots, whatever the inoculum used. Surprisingly, comparison between plants treated with *P. oligandrum* only and those treated with both the oomycete and the pathogen, i.e. *P. oligandrum* and *P. chlamy-*

Table 3

Expression levels (Fold Changes) of 6 selected genes that were either more induced, or less repressed, in plants inoculated with *P. oligandrum* + *P. chlamydospora* than in those infected only with *P. chlamydospora*. The values reported are means of 3 Fold Changes (FCs). * Indicates means that are, within a trial, significantly different between the two treatments at $P < 0.05$ (Kruskal–Wallis test). Pch: *P. chlamydospora*; PoP1, PoP2 and PoP3: *P. oligandrum*1 + *P. chlamydospora*, *P. oligandrum*2 + *P. chlamydospora* and *P. oligandrum*3 + *P. chlamydospora*. Pr10: PR protein 10, Chit3: Chitinase class III, Glu: β -1,3 glucanase, Pal: Phenylalanine ammonia lyase, Lox: Lipoxygenase 9, Gst: Glutathione S-transferase.

Genes	Trial A		Trial B		Trial C	
	Pch	PoP1	Pch	PoP2	Pch	PoP3
<i>Pr10</i>	3.08	8.11*	3.08	18.23*	0.68	1.23*
<i>Gst</i>	1.32	2.10	1.32	2.26*	2.16	2.54
<i>Glu</i>	0.70	20.56*	0.70	4.69*	1.39	1.62
<i>Lox</i>	0.97	4.85*	0.97	1.50*	0.91	1.03*
<i>Pal</i>	0.41	0.81*	0.41	1.23*	2.05	1.43*
<i>Chit3</i>	0.10	0.22*	0.10	0.49*	0.62	1.07*

Scale	0.3	0.7	1	2	3
	0.3	0.7	1	2	3

dospora, showed that *P. oligandrum* root colonization was higher in grapevine infected with *P. chlamydospora*. This trend was accentuated at the end of the experiment (4 months after inoculation). In order to explain this result, it could be hypothesized that the pathogen induced change in the plant physiology. This led to modifications in the emission and/or composition of root exudates which, in turn, had a positive influence on *P. oligandrum* colonization. Jones et al. (2004) suggested that the quantity and quality of root exudates both depend on the plant species, the age of individual plants and external biotic and abiotic factors.

Overall, the best level of grapevine root colonization by *P. oligandrum* was reached with the third inoculum (Po3), composed of the strains isolated from the rhizosphere of grapevine from the Bordeaux region (Gerbore et al., 2014). For the other two inocula evaluated (Po1 and Po2), at least one strain was obtained from the CBS collection. As hypothesized by Gerbore et al. (2014), vineyard strains may be more adapted to grapevine roots, thereby increasing the level of root colonization.

After investigating the colonization and persistence of *P. oligandrum* in the rhizosphere, the ability of the different oomycete inoculum (Po1, Po2, and Po3) to protect vine against *P. chlamydospora* was assessed. Whatever the *P. oligandrum*-inoculum used, the wood necroses of Cabernet Sauvignon cuttings caused by *P. chlamydospora* were significantly reduced when the oomycete strains colonized the root systems of young vines. To the best of our knowledge, this study shows, for the first time, the ability of *P. oligandrum* to protect vine against a fungus, *P. chlamydospora*, involved in grapevine trunk diseases. An earlier study by Mohamed et al. (2007), showed that *P. oligandrum*, by inducing plant defenses, protected vine against *B. cinerea* leaf infection.

In order to determine if *P. oligandrum* induces plant defense systems in our experiments, a set of 22 genes involved in grapevine defense mechanisms was used (Dufour, 2011; Dufour et al., 2013). PCA analyses indicated that, in all 3 trials, grapevine molecular responses to the different treatments were significantly differentiated. Moreover, plant responses to *P. oligandrum* treatment and mock inoculation were always separated from plant responses to *P. chlamydospora* infection and *P. oligandrum* + *P. chlamydospora* treatments.

Consequently, this difference in specific grapevine responses between treatments could be attributed to *P. chlamydospora* effect. Previous studies have shown that grapevine infection by *P. chlamydospora* induces plant defenses (Lorena et al., 2001; Bruno and Sparapano, 2006; Martin et al., 2009; Marta et al., 2011; Lambert

et al., 2013). Martin et al. (2009) also pointed out that infection of young *V. vinifera* plants (cvs. Chardonnay, Touriga National and two clones of cv. Aragonez) with *P. chlamydospora* induced changes in phenolic compounds in wood tissues, i.e. increased accumulations of trans-resveratrol and ϵ -viniferin after infection with the pathogen.

In our experiment, certain genes were expressed when *P. chlamydospora* infection occurred. For example, the *Gst* gene involved in the oxydo-reduction system was activated after infection with *P. chlamydospora*. This result agrees with that obtained by Valtaud et al. (2009). They showed that the expression of *Gsts*, the extent of glutathione accumulation and the ratio of glutathione disulfide (GSSG) to total glutathione are early indicators of the presence of Esca disease in grapevine canes.

In all 3 trials, 6 genes were more expressed in plants inoculated with *P. oligandrum* + *P. chlamydospora* than in those infected only with *P. chlamydospora*. Accordingly, plant response to the pathogen attack is stronger in the presence of *P. oligandrum*. The oomycete triggered increases in certain PR proteins (*Pr10*, *Chit3* and *Glu*), secondary metabolite (*Pal*), *Gst* and *Lox* transcript levels, when the pathogen attack occurred.

Consequently, it can be assumed that *P. oligandrum* promotes a particular physiological condition called priming, in which the plant is able to mobilize its defense reactions more intensely in response to *P. chlamydospora* attack.

In our experiments, 3 different inocula of *P. oligandrum* were used. However, similar *P. oligandrum* root colonization and reduction of *P. chlamydospora* necroses were obtained for all 3 trials. Moreover, we could identify six genes that were more specifically expressed in plants inoculated by the two microorganisms than in those infected by the pathogen only. Regarding genetic characteristics of *P. oligandrum* strains, few differences were observed for the oligandrin and cell wall protein genes (Gerbore et al., 2014). Consequently, these similarities in elicitor genes between the different strains and inocula may explain that results obtained in the different trials were relatively similar.

In conclusion, it has been shown that various inocula of *P. oligandrum* are able to protect young vines against *P. chlamydospora*, a pathogen involved in Esca. This study confirms the usefulness of *P. oligandrum* strains in inducing resistance and also that this is a common trait of many *P. oligandrum* strains. In each trial, specific grapevine responses were obtained according to the treatment applied to the vines, i.e. mock inoculation, *P. oligandrum* treatment, *P. chlamydospora* infection, *P. oligandrum* + *P. chlamydospora* treat-

ment. Certain genes associated with *P. chlamydospora* infection were more induced when plants were pre-treated with *P. oligandrum*. They will be used as markers of plant resistance against this trunk pathogen in the vineyards in further experiments.

Acknowledgments

The authors would like to thank the French Ministry of Agriculture for its financial support (V1302 Casdar research project on Grapevine Trunk Diseases), as well as the Tunisian Ministry of Scientific Research, the Poupelain Foundation and Biovitis.

References

- Abero, E., Martinez, S., Bettucci, L., Lupo, S., 2011. *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. in grapevines from Uruguay. *Phytopathol. Mediterr.* 50, 77–85.
- Alfonzo, A., Conigliaro, G., Torta, L., Burruano, S., Moschetti, G., 2009. Antagonism of *Bacillus subtilis* strain AG1 against vine wood fungal pathogens. *Phytopathol. Mediterr.* 48, 155–158.
- Ammad, F., Benchare, M., Toumi, M., 2014. Fungal pathogens associated with grapevine wood lesions in Algeria. *I. J. A. A. R.* 4, 8–15.
- Benhamou, N., Le Floch, G., Vallance, J., Gerbore, J., Grizard, D., Rey, P., 2012. *Pythium oligandrum*: an example of opportunistic success. *Microbiology* 159, 2679–2694.
- Benhamou, N., Rey, P., Cherif, M., Hockenhull, J., Tirilly, Y., 1997. Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defense-related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology* 87, 108–122.
- Benhamou, N., Rey, P., Picard, K., Tirilly, Y., 1999. Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and soilborne plant pathogens. *Phytopathology* 89, 506–517.
- Bertsch, C., Ramirez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E., 2013. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathol.* 62, 243–265.
- Bradshaw-Smith, R.P., Whalley, W.M., Craig, G.D., 1991. Interactions between *Pythium oligandrum* and the fungal foot rot pathogens of peas. *Mycol. Res.* 95, 861–865.
- Bruze, E., Lecomte, P., Grosman, J., Doublet, B., Bertsch, C., Fontaine, F., Ugaglia, A., Teissedre, P.L., Da Costa, J.P., Guerin-Dubrana, L., Rey, P., 2013. Overview of grapevine trunk diseases in France in the 2000s. *Phytopathol. Mediterr.* 52, 262–275.
- Bruno, G., Sparapano, L., 2006. 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. *Physiol. Mol. Plant.* 69, 209–223.
- Bustin, A., Benes, V., Garson, J., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M., Shipley, G., Vandesompele, J., Wittwer, C., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 4.
- Chebil, S., Fersi, R., Yacoub, A., Chenenaoui, S., Chattaoui, M., Melki, I., Zemni, H., Rhouma, A., Durante, G., Zacchi, E., Mliki, A., 2012. First report of *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata* and *Neofusicoccum luteum* associated with canker and dieback of grapevines in Tunisia. *Plant Dis.* 98, 3–420.
- Correia, K.C., Câmara, M.P.S., Barbara, M.A.G., Sales, R., Agusti-Briach, C., Gramaje, D., Leon, M., Gracia-Jimenez, J., Abad-Campos, P., Armengol, J., Micheref, S.J., 2013. Fungal trunk pathogens associated with table grape decline in Northeastern Brazil. *Phytopathol. Mediterr.* 52, 380–387.
- Diaz, G.A., Elfari, K., Latorre, B.A., 2012. First report of *Seimotosporium botan* associated with trunk disease of grapevine (*Vitis vinifera*) in chili. *Plant Dis.* 96, 1696–1696.
- Di Marco, S., Osti, F., Cesari, A., 2004. Experiments on the control of Esca by trichoderma. *Phytopathol. Mediterr.* 43, 108–115.
- Dufour, M.C., 2011. Study of the effectiveness of different genotypes of *Vitis vinifera* defenses induced by elicitors face to the genetic diversity of pathogens (*Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator*): from gene to the field (Ph. D. dissertation), Bordeaux University, No 1847, 335p.
- Dufour, M.C., Lambert, C., Bouscaut, J., Mérillon, J.M., Corio-Costet, M.F., 2013. Benzothiadiazole-primed defence responses and enhanced differential expression of defence genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*. *Plant Pathol.* 2, 370–382.
- Fourie, P.H., Halleen, F., 2006. Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* 116, 255–265.
- Gerbore, J., Benhamou, N., Vallance, J., Le Floch, G., Grizard, D., Regnault-Roger, C., Rey, P., 2013. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 4847–4860.
- Gerbore, J., Vallance, J., Yacoub, A., Delmotte, F., Grizard, D., Regnault Roger, C., Rey, P., 2014. Characterization of *Pythium oligandrum* populations that colonize the rhizosphere of vines from the Bordeaux region. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90, 153–167.
- Grosman, J., Doublet, B., 2012. Maladies du bois de la vigne. Synthèse des dispositifs d'observation au vignoble, de l'observatoire 2003–2008 au réseau d'épidémiologie-surveillance actuel. *Phytoma* 651, 31–35.
- Guerin-Dubrana, L., Labenne, A., Labrousse, J.C., Sylvie, B., Rey, P., Gegout-Petit, A., 2013. Statistical analysis of grapevine mortality associated with esca or eutypa dieback foliar expression. *Phytopathol. Mediterr.* 52, 276–288.
- Jeffers, S.N., Martin, S.B., 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Dis.* 70, 1038–1043.
- Jones, D., Hodge, A., Kuzyakov, Y., 2004. Plant and mycorrhizal regulation rhizodeposition. *New Phytol.* 163, 459–480.
- Kaliternam, A., Milicevic, T., 2013. First report of *Neofusicoccum parvum* associated with grapevine trunk diseases in Croatia. *Plant Dis.* 97, 1656–1656.
- Kotze, C., Van Niekerk, J., Halleen, F., Mostert, L., Fourie, P., 2001. Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathol. Mediterr.* 50, 247–263.
- Lambert, C., Khook, K., Lucas, S., Téléf-Micouleau, N., Mérillon, J.M., Cluzet, S., 2013. A faster and a stronger defense response: one of the key elements in grapevine explaining its lower level of susceptibility to Esca? *Phytopathology* 103, 1028–1034.
- Larignon, P., Fontaine, F., Farine, A., Clément, C., Bertsch, C., 2009. Esca et black dead arm: deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la Vigne. *C. R. Biol.* 332, 765–783.
- 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. *Phytopathol. Mediterr.* 48, 32–46.
- Lherminier, J., Benhamou, N., Larrue, J., Milat, M.L., Boudon-Padieu, E., Nicole, M., Blein, J.P., 2003. Cytological characterization of elicitor-induced protection in tobacco plants infected by *Phytophthora parasitica* or phytoplasma. *Phytopathology* 93, 1308–1319.
- Le Floch, G., Benhamou, N., Mamaca, E., Salerno, M.I., Tirilly, Y., Rey, P., 2005. Characterisation of the early events in atypical tomato root colonisation by a biocontrol agent, *Pythium oligandrum*. *Plant Physiol. Biochem.* 43, 1–11.
- Le Floch, G., Rey, P., Dénél, F., Benhamou, N., Picard, K., Tirilly, Y., 2003. Enhancement of development and induction of resistance in tomato plants by the antagonist, *Pythium oligandrum*. *Agron* 23, 455–460.
- Le Floch, G., Vallance, J., Benhamou, N., Rey, P., 2009. Combining the oomycete *Pythium oligandrum* with two other antagonistic fungi: root relationships and tomato grey mold biocontrol. *Biol. Control* 50, 288–298.
- Lorena, T., Calamassi, R., Mori, B., Mugnai, L., Surico, G., 2001. *Phaeoconiella chlamydospora* grapevine interaction: histochemical reactions to fungal infection. *Phytopathol. Mediterr.* 40, 400–406.
- Lorrain, B., Ky, I., Pasquier, G., Jourdes, M., Guérin-Dubrana, L., Gény, L., Rey, P., Donèche, B., Teissedre, P.L., 2012. Effect of Esca disease on the phenolic and sensory attributes of Cabernet Sauvignon grapes musts and wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* 18, 64–72.
- Maher, N., Piot, J., Bastien, S., Vallance, J., Rey, P., Guerin-Dubrana, L., 2012. Wood necrosis in Esca-affected vines: types, relationships and possible links with foliar symptom expression. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 46, 15–27.
- Marta, R.M., Federico, F., Alberto, C.P., 2011. Response of *Vitis vinifera* cell cultures to *Phaeoconiella chlamydospora*: changes in phenolic production, oxidative state and expression of defence-related genes. *Eur. J. Plant Pathol.* 132, 133–146.
- Martin, F.N., Hancock, J.G., 1987. Association of chemical and biological factors in soils suppressive to *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 76, 1221–1231.
- Martin, N., Vessentini, D., Rego, C., Monteiro, S., Oliveira, H., Boavida, F., 2009. *Phaeoconiella chlamydospora* infection induces changes in phenolic compounds content in *Vitis vinifera*. *Phytopathol. Mediterr.* 48, 101–116.
- Masunaka, A., Sekiguchi, H., Takahashi, H., Takenaka, S., 2010. Distribution and expression of elicitor-like protein genes of the biocontrol agent *Pythium oligandrum*. *Phytopathology* 158, 417–426.
- Mohamed, N., Lherminier, J., Farmer, M.J., Fromentin, J., Beno, N., Houot, V., Milat, M., Blein, 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, 611–620.
- Mohammadi, H., Gramaje, D., Banihashemi, A., Armengol, J., 2013. Characterization of *Diplodia seriata* and *Neofusicoccum parvum* associated with grapevine decline in Iran. *J. Agric. Sci. Technol.* 15, 603–616.
- Mondello, V., Piccolo, S., Conigliaro, G., Alfonzo, A., Torta, L., Bunuano, S., 2013. First report of *Neofusicoccum vitifusiforme* and presence of other Botryosphaeriaceae species associated with Botryosphaeria dieback of grapevine in Sicily (Italy). *Phytopathol. Mediterr.* 52, 388–396.
- Picard, K., Ponchet, M., Blein, J.P., Rey, P., Tirilly, Y., Benhamou, N., 2000. Oligandrin a proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant Physiol.* 124, 379–395.
- van der Plaats-Niterink, A.J., 1981. Monograph of the genus *Pythium*. *Stud. Mycol.* 21, 1–242.
- Rego, C., Oliveira, H., Carvalho, A., Phillips, A., 2000. Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. *Phytopathol. Mediterr.* 39, 76–77.
- Reid, K.E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., Lund, S.T., 2006. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol.* 6, 27.
- Rey, P., Floch, G.L., Benhamou, N., Tirilly, Y., 2008. *Pythium oligandrum* biocontrol: its relationships with fungi and plants. In: Ait Barka, E., Clément, C. (Eds.), *Plant-microbe interactions*, Research Signpost, Kerala, India, pp. 43–67.

- Takenaka, S., Nakamura, Y., Kono, T., Sekiguchi, H., Masunaka, A., Takahashi, H., 2006. Novel elicitor-like proteins isolated from the cell wall of the biocontrol agent *Pythium oligandrum* induce defence-related genes in sugar beet. *Mol. Plant Pathol.* 7, 325–339.
- Takenaka, S., Nishio, Z., Nakamura, Y., 2003. Induction of defense reactions in sugar beet and wheat by treatment with cell wall protein fractions from the mycoparasite *Pythium oligandrum*. *Phytopathology* 93, 1228–1232.
- Takenaka, S., Sekiguchi, H., Nakaho, K., Tojo, M., Masunaka, A., Takahashi, H., 2008. Colonization of *Pythium oligandrum* in the tomato rhizosphere for biological control of bacterial wilt disease analyzed by real-time PCR and confocal laser-scanning microscopy. *Phytopathology* 98, 187–195.
- Takenaka, S., Tamagake, H., 2009. Foliar spray of a cell wall protein fraction from the biocontrol agent *Pythium oligandrum* induces defence-related genes and increases resistance against *Cercospora* leaf spot in sugar beet. *J. Gen. Plant Pathol.* 75, 340–348.
- Urbez-Torres, J.R., Peduto, F., Striegler, R.K., Urrea-Romero, K.E., Rupe, J.C., Cartwright, R.D., Gubler, W.D., 2012. Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. *Fungal Divers* 52, 169–189.
- 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. *Am. J. Enol. Vitic.* 60, 497–507.
- Valtaud, C., Foyer, C.H., Fleurat-Lessard, P., Bourbouloux, A., 2009. Systemic effects on leaf glutathione metabolism and defence protein expression caused by esca infection in grapevines. *Func. Plant Biol.* 6, 260–279.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalisation of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Gen. Biol.* 3, 1–12.
- Yan, J.Y., Li, X.H., Kong, F.F., Wang, Z.Y., Gong, L.Z., He, H.P., 2011. Occurrence of grapevine trunk disease caused by *Botryosphaeria rhodina* in China. *Plant Dis.* 95, 2–219.

Partie I.2

Analyses transcriptomiques à haut débit de l'interaction tripartite *Pythium oligandrum*, *Vitis vinifera* et *Phaeomoniella chlamydospora*, un agent pathogène du bois

Introduction

Lors de la partie précédente, l'aptitude des différentes souches de *P. oligandrum* à coloniser et à protéger les jeunes plants de vigne contre *P. chlamydospora* a été démontrée. Les réponses transcriptomiques spécifiques de 22 gènes impliqués dans les défenses de la vigne ont été quantifiées. Durant 3 essais, les résultats de RT-qPCR ont montré que les profils de réponse de la plante aux différents traitements (l'agent antagoniste, *P. oligandrum*, le champignon pathogène, *P. chlamydospora*, ou les 2 micro-organismes), 14 jours après l'infection par l'agent pathogène. Six gènes (*Pr10*, *Gst*, *Glu*, *Lox*, *Pal* et *Chit*) qui sont induits suite à l'infection par *P. chlamydospora*, sont plus exprimés quand les plants sont pré-inoculés par *P. oligandrum*. Par contre ces gènes étudiés ne sont pas spécifiques à cette interaction et ils sont induits suite à plusieurs stress biotiques. Dufour et al. (2013) ont en effet testé cette série de gènes pour étudier les réponses de la vigne, au niveau foliaire, contre l'oïdium et le mildiou après avoir traité les plants par un analogue de l'acide salicylique le BTH (le benzothiadiazole).

Suite à cette première étude, l'objectif de la présente partie a été d'identifier des gènes marqueurs spécifiques de cette interaction tripartite : *V. vinifera*, *P. oligandrum* et *P. chlamydospora*. La première étape a consisté à étudier les réponses transcriptomiques globales de la vigne aux différents traitements, au niveau du bois par des analyses microarrays et RNAseq. De plus, les analyses RNAseq au niveau du bois nous permettront d'étudier l'influence de la présence de l'agent antagoniste *P. oligandrum* sur la réponse transcriptomique globale de l'agent pathogène *P. chlamydospora* (production de métabolites secondaires dont les toxines, facteurs de transcriptions, stress biotique, etc.). Cette étude se focalise sur l'analyse des échantillons issus de l'essai B (cf partie I.1) pour lequel, les meilleurs résultats de protection ont été obtenus (50 % de réduction de nécroses).

La transcriptomique est l'étude de l'ensemble des ARN messagers (ARNm) issus de la transcription du génome. En effet, la mesure de l'expression de gènes permet d'évaluer l'effet des conditions environnementales sur la modification de l'activité cellulaire. Différentes techniques permettent ces études, *i.e.* la PCR quantitative, le séquençage haut débit des ARNm (appelé aussi RNAseq) ou encore les puces à ADN (ou microarrays). Ces 2 dernières techniques étant utilisées dans la présente partie, elles seront décrites ci-après

La technologie de puce à ADN ou microarray

Le génome de *V. vinifera* (504.6Mb, 30 000 gènes environ) a été séquencé par Jaillon et al. (2007) avec le cépage Pinot noir « clone ENTAV 115 ». Suite à cela, la technique des microarrays a été fréquemment utilisée pour étudier les réponses transcriptomiques chez cette plante (Albertazzi et al., 2009 ; Camps et al., 2010 ; Damiani et al., 2012 ; Fung et al., 2008 ; Hren et al., 2009 ; Marchive et al., 2013 ; Rotter et al., 2009). La puce Nimblegen vigne (*Vitis vinifera* micro-array, Roche-Nimblegen® 12x135K- GEO: GPL13936) a été sélectionnée dans notre étude car elle permet d'évaluer le niveau d'expression de tous les gènes connus et prédits par le séquençage de cette plante, soit 29 549 gènes.

Les puces à ADN permettent de mesurer simultanément les niveaux d'expression relatifs de milliers de gènes, voire de l'ensemble du génome d'un organisme. Cette technologie basée sur l'hybridation de séquences complémentaires de 2 brins d'ADN consiste à utiliser : (i) des sondes, qui sont des fragments d'ADN ayant une séquence connue fixés sur un substrat (des lames de verre pour la technologie Nimbelgen) (ii) Des séquences biologiques inconnues (ADNc issus d'un échantillon) préalablement marquées par un fluorophore et appelées cibles, qui s'associeront par hybridation à la sonde lorsque les séquences sont complémentaires. Les signaux d'hybridation sont détectés et quantifiés par mesure de fluorescence (Figure 1).

La principale limitation de cette technique réside dans le fait qu'elle dépend de la connaissance de la séquence génétique déposée. L'application ne peut se faire qu'avec des organismes dont un grand nombre d'Expressed Sequence Tag (EST) a été recensé dans les bases de données, ou dont le génome entier a été séquencé. De plus, cette technique ne permet pas de détecter les gènes qui sont faiblement exprimés.

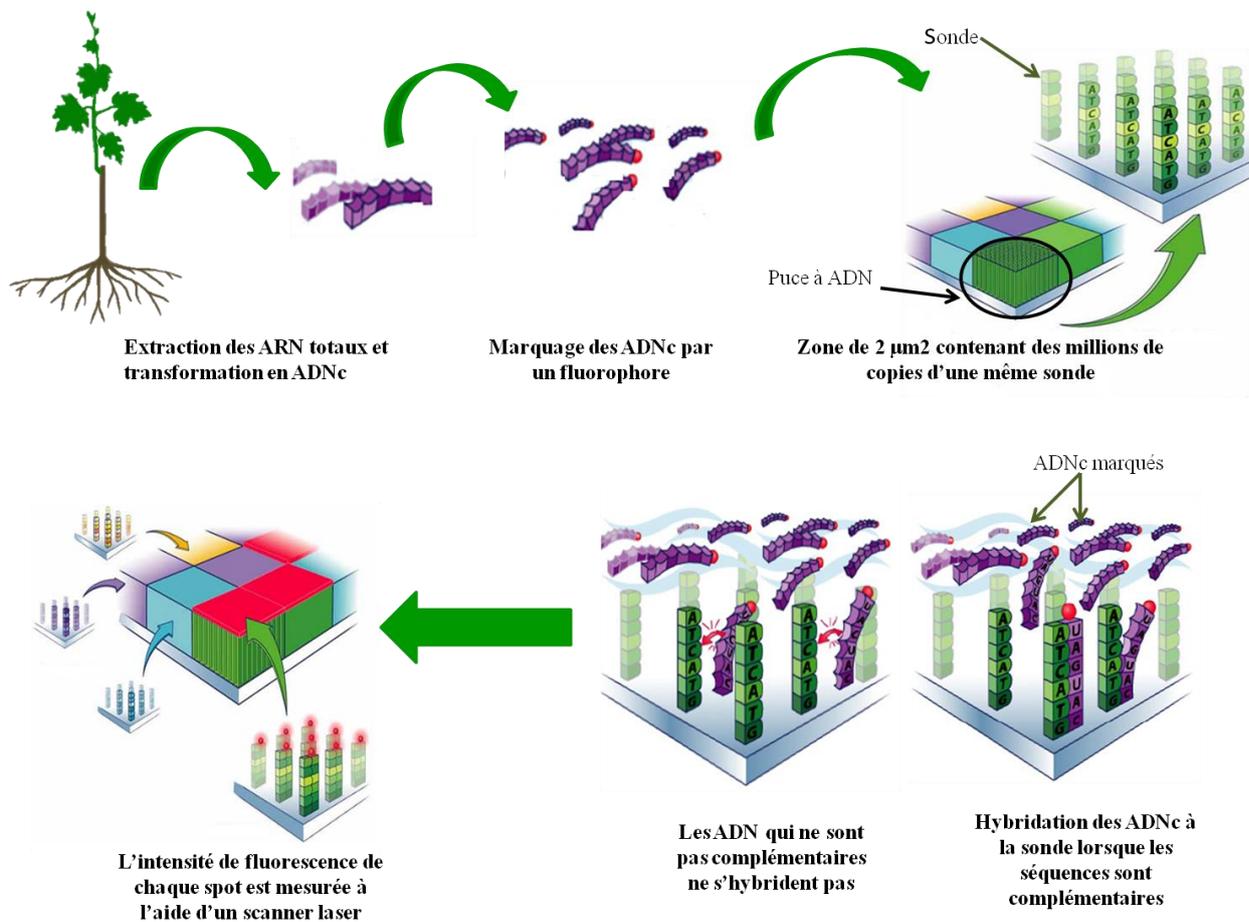


Figure 1 : Les principales étapes de la technique microarrays

La première étape de cette technique consiste à extraire les ARN totaux et à les transformer, par réverse transcriptase, en ADN complémentaire (ADNc). Ces derniers sont marqués, puis hybridés avec les sondes spécifiques de gènes placés sur les spots d'une lame (Kar Chun Tan et al., 2009). Dans notre cas, les lames Nimblegen utilisées sont des lames de verre. Chaque lame comporte 12 spots comprenant chacun 135 000 sondes. Après hybridation, l'intensité relative de fluorescence de chaque spot est mesurée à l'aide d'un scanner laser (Figure 1). Pour chaque gène, les différences de niveaux de fluorescence entre les différents échantillons indiquent une surexpression ou une répression du gène (Kar Chun Tan et al., 2009). Après normalisation des données, l'identification des catégories fonctionnelles différentiellement exprimées sera réalisée à l'aide d'un traitement statistique.

Description de la technique de RNAseq (Analyse transcriptomique globale)

Le RNAseq est une technique de séquençage à haut débit qui mesure simultanément l'abondance des séquences d'ARN pour l'ensemble des gènes présents dans les différents échantillons. Le nombre de séquences lues (appelées aussi « reads ») et alignées sur une région d'intérêt (le gène par exemple) est considéré comme proportionnel au niveau d'expression de cette région d'intérêt. En effet, plus un gène s'exprime, plus grand est le nombre de ses transcrits. Les principales étapes de cette technique sont présentées dans la figure ci dessous.

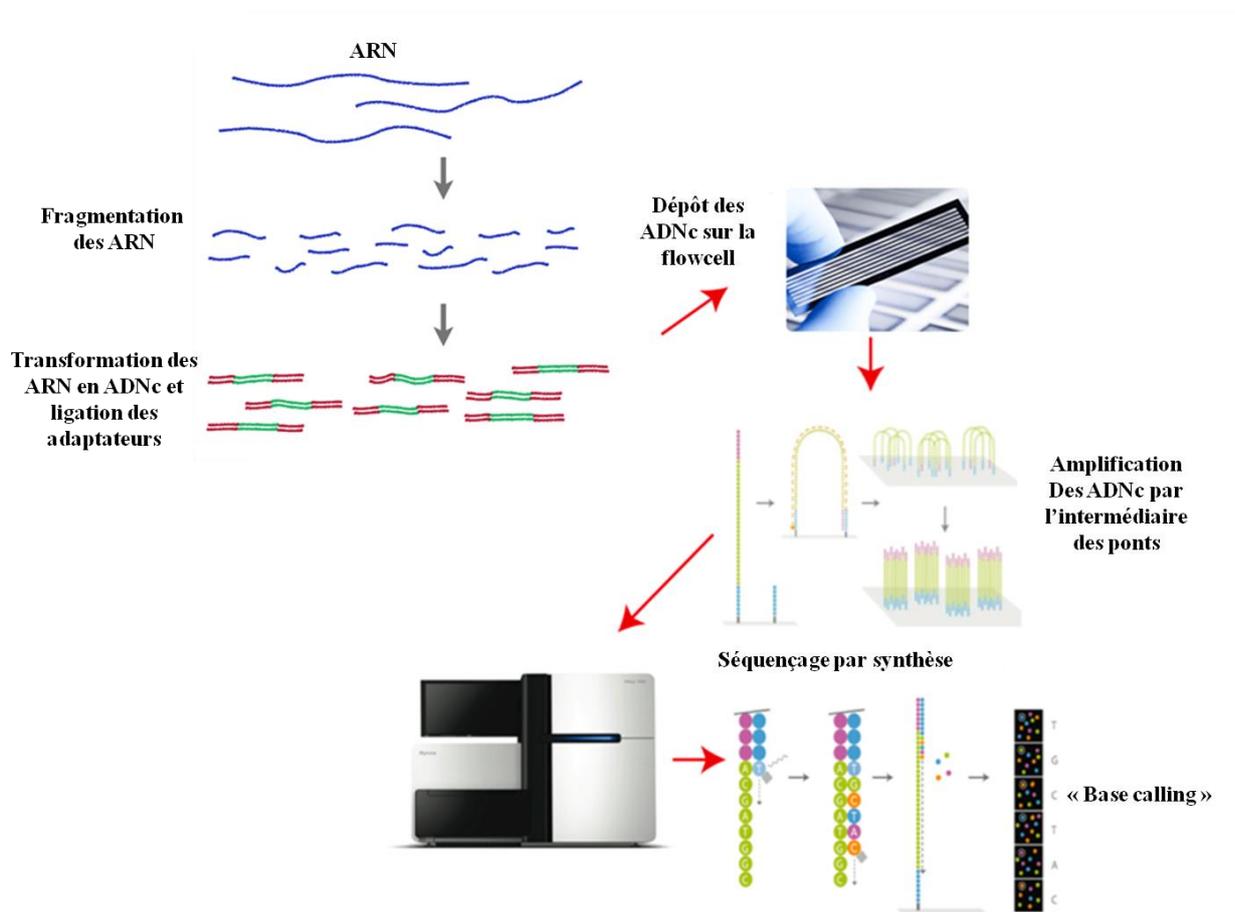


Figure 2 : Les principales étapes de la technique RNAseq

Au niveau de son principe général, le RNAseq consiste d'abord à préparer les librairies pour le séquençage. En effet, la préparation des librairies repose sur la fragmentation des ARN extraits en petits fragments de longueur connus (la taille moyenne est de 100 paires bases). Ces fragments sont transformés en ADNc et des adaptateurs étiquetés (contenant des séquences permettant l'hybridation sur la « flowcell ») sont rajoutés par ligation (Figure 2). Après des étapes de nettoyage, amplification et contrôle qualité, les librairies sont prêtes pour le séquençage. Après préparation des librairies, ces dernières sont hybridées à des « flowcells ». Ce sont des lames qui contiennent des séquences nucléotidiques complémentaires aux adaptateurs déjà fixés sur les ADNc. Chaque lame contient 8 canaux, un échantillon est séquencé sur un canal, mais il peut y avoir du multiplexage (plus d'un échantillon sur le canal). Après extension de l'hybridation, les acides nucléiques déposés sur la « flowcell » sont amplifiés par l'intermédiaire des ponts. Le séquenceur utilisé dans notre étude est un Illumina HiSeq 2500. Les lectures ont été réalisées en fragments jumelés ou « paired-end » ce qui favorise la détection des transcrits car cela permet d'augmenter les tailles de fragments obtenus. Le principe du séquençage par synthèse consiste à incorporer une base fluorescente (une couleur/base). L'acquisition de l'image par l'intermédiaire d'un jeu de caméras s'effectue en temps réel à chaque cycle pour chaque couleur. A partir des images prises, la séquence sera reconstituée. La correspondance entre la fluorescence et la base s'appelle « base calling ». D'où, la génération des reads (> 30 nucléotides). Enfin, les reads sont alignés sur le génome de l'espèce, c'est-à-dire que dans le génome la position d'une sous-séquence similaire à celle du read est recherchée.

Par rapport aux méthodes de PCR et de puces à ADN qui détectent uniquement les ARNs connus, le RNAseq est une technique de transcriptomique sans *a priori* qui permet d'étudier les ARNs non connus (Nielsen et al., 2010). Ainsi, l'utilisation de cette technologie sera probablement l'occasion de découvrir de nouvelles unités transcriptionnelles et de nouveaux gènes qui n'auraient pas été annotés faute de structures géniques caractéristiques. Cette technique permet donc d'analyser tous les ARN présents dans un échantillon biologique, il sera possible d'obtenir des séquences issues du génome de la plante, mais aussi celles des micro-organismes colonisant les tissus végétaux étudiés. Dans notre étude, l'utilisation de la technologie RNAseq permettra d'affiner notre connaissance sur les réponses transcriptionnelles de la plante (ici la vigne) et de l'agent pathogène (*P. chlamydospora*) inoculé.

Publication n°3

“High-throughput transcriptional analyses of a tri-partite interaction between an oomycete biocontrol agent, *Pythium oligandrum*, a pathogen, *Phaeomoniella chlamydospora*, involved in Esca, a Grapevine Trunk Disease, and *Vitis vinifera* L.”

En préparation

High-throughput transcriptional analyses of a tri-partite interaction between an oomycete biocontrol agent, *Pythium oligandrum*, a pathogen, *Phaeoconiella chlamydospora*, involved in Esca, a Grapevine Trunk Disease, and *Vitis vinifera* L.

Amira Yacoub^{1,3}*, Noël Magnin^{1*}, Jonathan Gerbore^{1,4*}, Emilie Bruez^{1,2}, Damien Grizard⁴, Stéphane Compant⁵, Guyoneaud Remy³ and Patrice Rey^{1,2}

¹ INRA, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE), ISVV, 33883 Villenave d'Ornon, France; ² Bordeaux Sciences Agro, Université de Bordeaux, ISVV, UMR1065 SAVE, 33883 Villenave d'Ornon, France; ³ Equipe Environnement et Microbiologie, Institut des Sciences Analytiques et de Physico-Chimie pour l'Environnement et les Matériaux, CNRS-UPPA-UMR-5254, IBEAS, Avenue de l'Université, Pau, 64013, France; ⁴ BIOVITIS, 15400 Saint Etienne de Chomeil, France. ⁵ AIT Austrian Institute of Technology GmbH, Bioresources Unit, Health & Environment Department, Konrad Lorenz Strasse 24, 3430 Tulln, Austria.

Corresponding author: *Patrice Rey*

Tel: +33557350760

Email: prey@bordeaux.inra.fr

*These authors contributed equally to this work.

Summary

- *Phaeomoniella chlamydospora* is an Esca (Grapevine Trunk Disease)-associated ascomycete, causing wood destruction and, ultimately, plant death. Given the lack of pesticides chemicals to treat this disease, alternative methods with great potential, such as biological control, are currently being developed. Vines inoculated with an oomycete, *Pythium oligandrum*, which is equally a biocontrol agent (BCA), reduced stem infection caused by *P. chlamydospora*, thereby inducing grapevine defence reactions. Molecular data about this plant-pathogen-BCA interaction, and how the biocontrol agent can reduce pathogen virulence and its development inside grapevine are, however, required.
- Transcriptome analyses of grapevine and *P. chlamydospora* at wood level, were analyzed on plants challenged with *P. oligandrum* in the present study.
- Microarray analyses showed that *P. oligandrum* induces, *per se*, a few changes on the plant transcriptome, but primes the plant responses in presence of the pathogen. Certain similarities with Induced Systemic Resistance (ISR), promoted by microorganisms were detected with specificities in the induction of genes related to jasmonate pathway enzymes and ethylene-responsive transcription factors. RNAseq analyses provided identification of the genes expressed by *P. chlamydospora* during infection, in plants colonized or not with *P. oligandrum*. These genes were related to secondary metabolite biosynthesis, carbohydrate-active enzymes, and to transcription regulators involved in known regulation pathways in fungi. New data about *P. oligandrum* modulation of grapevine infection by the pathogen were also obtained.
- Transcriptome analyses of this tri-partite interaction provide a useful foundation for further functional analyses of plant and pathogen genes in the process of Esca disease establishment in grapevine, and the reduction of symptoms, using *P. oligandrum*.

Introduction

Alternatives to the chemical management of pathogens in agriculture are actively being sought, and biological control agents (BCAs) could well be part of the solution. Grapevine is infected by many fungal pathogens, mostly controlled by fungicide sprayings, except for wood-borne diseases, which are of increasing concern, as no efficient chemical molecules are currently registered (Bertsch *et al.*, 2013). The search for alternative treatments is under way, with the use of BCAs being currently investigated. Several biological microorganisms, such as antagonistic fungi, rhizobacteria, endophytic bacteria and mycorrhiza, have been frequently used to reduce plant disease symptoms, as described in the literature (Pieterse *et al.*, 2014). Most of these beneficial organisms induce plant-systemic resistance, which involves hormonal signalling and specific transcription factors.

These beneficial microbes, which sensitize the plant immune system and enhance its defences, without more costly ones being activated, produce elicitors such as lipopolysaccharides, pyocyanin, flagella. These are responsible for the onset of induced systemic resistance (ISR) which involves, for example, one or more long-distance signals that start at the root-microbe interface. Plant root signalling components, like Ethylene (ET) and R2R3-type MYB transcription factor gene MYB72, are important for the initiation of ISR (Knoester *et al.*, 1999; Verhagen *et al.*, 2004). It has also been demonstrated that Jasmonic Acid (JA) and ET are central players in the regulation of ISR by beneficial microorganisms (Pieterse *et al.*, 1998). In the *Arabidopsis thaliana* model, ISR is shown to be associated with elevated transcript levels of a set of transcription factor genes, such as the Apetala2/Ethylene Response Factors (AP2/ERF) family, which includes major regulators of specific metabolic pathways (Van der Ent *et al.*, 2009). Previous studies have reported that several members of the AP2/ERF family, such as ERF1 and Octadecanoid-Responsive Arabidopsis59 (ORA59), are implicated in the regulation of JA and ET-dependent defences (Lorenzo *et al.*, 2003; Pré *et al.*, 2008; Memelink, 2009). Furthermore, basic helix–loop–helix (bHLH) transcription factors, type MYC, have a function as activators of JA-dependent defence responses (Cheng *et al.*, 2011; Fernández-Calvo *et al.*, 2011; Niu *et al.*, 2011). However, other bHLH transcription factors (JAM1, JAM2 and JAM3) are negative regulators of JA responses in *A. thaliana* (Sasaki-Sekimoto *et al.*, 2013). Analysis of the ISR transcriptome of *A. thaliana*, before and after pathogen challenge, confirms that ISR is associated with the potentiated expression of JA/ET-regulated genes that are induced in response to pathogen infection. This phenomenon, called priming, is characterized by a faster and/or stronger activation of cellular

defences after pathogen attack (Conarth *et al.*, 2006). The characterization of the molecular events specific to an interaction is important in order to develop specific tests, which can provide valuable information about the best conditions required for efficient ISR establishment in a defined tri-partite plant /pathogen/BCA interaction.

Applying BCAs on plants is, therefore, useful to control diseases, particularly when chemical pesticides have been banned or are lacking. This is the case for grapevine trunk diseases (GTDs), *i.e.* Esca, *Eutypa* and Botryosphaeriae diebacks, in Europe. GTDs have increased worldwide over the last 15 years and, in France, all the wine-producing regions are affected, with approximately 13% of its vineyards currently unproductive, essentially because of Esca. Recently, one strain of *Trichoderma atroviride* was registered to control Esca disease but other microorganisms, such as the oomycete, *Pythium oligandrum*, which is widely present in agricultural soils, including those of vineyards (Gerbore *et al.*, 2014b), have shown potential in controlling grapevine pathogens. The treatment of *Vitis vinifera* L. roots with *P. oligandrum* is associated with a reduction in *Botrytis cinerea* infection at leaf level (Mohamed *et al.*, 2007), but also in *Phaemoniella chlamydospora*, a fungal pathogen involved in Esca, which attacks the trunk of vines (Yacoub *et al.*, 2016). Le Floch *et al.* (2009) have also shown that the various combinations of *P. oligandrum* with 2 other BCAs, *Trichoderma harzianum* and/or *Fusarium oxysporum*, display similarities in terms of induced systemic resistance against *B. cinerea* attacks on tomato plants. The main difference between the three BCAs is the unique ability of *P. oligandrum* to deeply and rapidly penetrate the inner tomato root tissues during the endophytic phase of the oomycete. Hence, the use of a BCA to control Esca could well be an interesting approach for viticulturists.

P. chlamydospora, one of the most aggressive species among Esca fungi (Laveau *et al.*, 2009), can be used to monitor the expansion of the pathology in a semi-controlled environment. Technically-demanding but relatively unexplored approaches, such as the dual sequencing of transcripts at the infection site (Westermann *et al.*, 2012), are needed to relate the size of the fungal necroses caused by *P. chlamydospora* to the level of expression of transcripts. This is essential both for grapevine, in order to follow the defensive reactions of the plant, and the fungus, to uncover the fungal genes involved in the pathology. Proteomic experiments on Esca-affected grapevines have been performed (Spagnolo *et al.*, 2012), but the field-collected data do not correspond to the infected portion of the grapevine wood. Despite active research (Morales-Cruz *et al.*, 2015), little is known about the molecular events induced by GTD pathogens or by the biocontrol agent *P. oligandrum*. The advent of

molecular data resulting from the whole genome sequencing of several GTD pathogens (Blanco-Ulate *et al.*, 2013a,b; Antonielli *et al.*, 2014) paves the way for obtaining molecular insights about the genes involved in the pathological processes at the plant and fungal levels, and also for understanding the plant resistance mechanisms induced by *P. oligandrum*.

In this study: (i) the plant and fungal molecular events, associated with an Esca-pathogenic fungus, *P. chlamydospora*, within grapevine wood at the infection site, were deciphered and (ii) the transcriptionally-induced modulation of infection by the biological control agent, *P. oligandrum*, was also characterized.

Materials and methods

Plant and microorganism materials

In this study, grapevine wood sampled collected in an experiment previously published (Yacoub *et al.*, 2016) were used. The assay was conducted in a greenhouse with *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon 2-node cuttings, inoculated or not with the biocontrol agent at the root level and infected or not with an Esca pathogen at the stem level.

Briefly, at 7-8 leaf stage, grapevine plants were infected with *P. chlamydospora* strain (SO37) at the stem level. *P. oligandrum* root inoculation (Po2 at 2×10^4 oospores per ml suspension) was realized twice at 4 days intervals, one seven days and the second inoculation three days before pathogen infection.

In this study, we decided to further analyzed the treatment showing a mean root colonization level by the BCA of 39% and the highest plant protection level (50%) against the pathogen (Fig. 1S). It corresponds to the Po2 treatment, we also integrated the different control treatments for comparison between experimental conditions.

Thus, the experimental design consisted in 5 conditions that was plants (i) inoculated on roots with *P. oligandrum*; (ii) infected by the pathogenic agent *P. chlamydospora* in the stem; (iii) pretreated on roots with *P. oligandrum* and infected then with *P. chlamydospora*; (iv) mock inoculation (cuttings with a hole) (v) control cuttings without any treatment.

For the transcriptome analyses presented in this study, stems of nine plants per treatment were collected and pooled on three replicates (3 plants per replicate) in order to reduce biological variation related noise. Collected materials at 0-dpi (0 days post infection, i.e. 2 hours after pathogen infection) and 14-dpi were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used.

RNA extraction

Wood samples were ground in liquid nitrogen and 200 mg aliquots were used for RNA extraction. A commercial RNA extraction kit (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen) was used with modifications as previously described (Yacoub *et al.*, 2016). Total RNA samples were subjected to standard quality controls: Nanodrop (ND-1000, ThermoScientific) for all samples and BioAnalyser (Agilent) for microarray and RNAseq samples. Samples were stored at -80°C before use in RT-qPCR experiments or stored at -80°C before being shipped in dry ice

either to the GeT platform (Toulouse, France) for subsequent MicroArray analyses or the IGBMC Sequencing platform (Strasbourg, France) for RNAseq analyses.

Microarray analyses, data processing and deposition

The microarrays used were the grape whole-genome microarrays from Nimblegen, Roche (Design name 090918 Vitus exp HX12). Microarray hybridizations were performed by the Get Platform (Toulouse, France - <http://get.genotoul.fr/>), according to the manufacturer's instructions. The microarray data were analyzed using the statistical package R, version 2.14.0 (R Development Core Team, 2005) with various Bioconductor packages (<http://www.bioconductor.org>, Gentleman *et al.*, 2004). Microarray quality controls were performed using the arrayQualityMetrics package (Kauffmann *et al.*, 2009). Expression intensities were background corrected, quantile-normalized, and summarized using the RMA function of the oligo package (Carvalho & Irizarry, 2010). The raw and normalized microarray data are available in the ArrayExpress database (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) under accession number E-MTAB-12345.

Differentially expressed (DE) genes were identified using the limma package (Smyth, 2005) at a P value < 0.01 within the MultiExperiment Viewer software MeV (Saeed *et al.*, 2003). The \log_2 ratios were used to obtain contrastingly regulated genes between 0 and 14 dpi, for each treatment.

RNAseq analyses

RNAseq library preparation was performed using a rRNA-depletion kit (RiboZero, <http://www.epibio.com>), as recommended by the manufacturer. Sequencing was performed by the IGBMC Microarray and Sequencing platform, a member of the "France Génomique" consortium (ANR-10-INBS-0009). The libraries were sequenced on an Illumina HiSeq 2500 as paired-end 100 base reads following Illumina's instructions. Image analysis and base calling were performed using RTA 1.17.21.3 and CASAVA 1.8.2. Files containing raw data (fastq files) obtained from the IGBMC Sequencing platform were transferred to the Bioinformatics servers of the GenoToul bioinformatics facility and analyzed remotely by connecting to the linux cluster. RNAseq analyses essentially followed the protocols described in (Trapnell *et al.*, 2012). RNAseq data are available in the ArrayExpress database (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) under accession number E-MTAB-3966.

RT-qPCR experiments

RNA retro-transcription was performed with the Superscript III kit from Invitrogen (using oligo(dT) primers, 1.5 µg of RNA, and according to the manufacturer's instructions). Gene expression was analyzed on a Stratagene MX3005P PCR machine (Agilent technologies), with a kit MESA BLUE qPCR for SYBR[®] (Eurogentec, Belgium).

Raw data were exported using the software from the PCR equipment, and analyzed using the LinRegPCR software (Ruijter *et al.*, 2009). Primers were designed on the NCBI (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) website using the Primer-Blast utility (Ye *et al.*, 2012). Sequences used for RT-qPCR and corresponding primers are given in Table 1S and sequences used as reference in table 2S. The comparison of microarray and qPCR levels of expression was done by regression analysis (Fig. 2S).

Results

The plant transcriptional response over time

Differentially expressed (DE) genes in the plant wood tissues were investigated both in a time frame approach (0- vs 14-dpi *V. vinifera* microarrays) and in a more detailed sample comparison approach, 14 days after infection by the pathogen (14-dpi RNAseq experiments).

Grapevine global responses evaluated by microarrays

Transcriptomic analysis of *P. oligandrum*-treated plants at 0- vs 14-dpi, revealed that a total of 189 genes were differentially expressed. Most of these genes (70%, green genes) were over expressed at 0-dpi. Few functional categories showed a statistical significance (Fig. 2a). Stress-associated genes showed over-expression at 0-dpi. On the contrary, Polyamine metabolism (two S-adenosylmethionine decarboxylase genes, SAM), and three GCN5-related-N-acetyltransferase associated genes, showed respectively over-expression at 14-dpi). Hormonal metabolism, on the basis of DE genes, concerned ethylene, gibberellin, salicylic acid at 0-dpi and cytokinin at 14-dpi. Other important functional categories with less statistical significance were: transcriptional regulation with involvement of the AP2-EREBP (Apetala2 Ethylene-responsive element binding protein) transcription factor family that are over-expressed at 0-dpi (3 genes), Basic Helix-Loop-Helix type transcription factor at 14-dpi (1 gene).

Our biological system includes wounding in the pathogen infection process and this induces a strong plant response. We had to take this into consideration, because some genes induced by *P. chlamydospora* and/or *P. oligandrum* are susceptible to be induced by the wounding process as well. Consequently, plant responses to these different treatments (mock inoculation, *P. chlamydospora* and *P. oligandrum*/*P. chlamydospora*) were compared, in order to evaluate grapevine transcriptomic changes induced by each treatment. Genes differentially expressed between 0- and 14-dpi timings were obtained by limma analysis (P value < 0.01), resulting in the following numbers: mock treatment (1371 genes), pathogen treatment (2235 genes), and pathogen treatment in the presence of the root BCA (1858 genes). A comparison of these DE genes between treatments was then performed by a Venn diagram (Fig. 2b), where the number of specific and common genes detected is shown for the three treatments. Genes specific for each treatment were thus obtained and the biological significance compared (Mapman functional category enrichment). The combined effect of all

treatments gave rise to many DE genes (898, Fig. 2b), and the analysis by functional categories in Mapman software indicates that the amplitude of expression appears to play a major role (data not shown).

Many interesting features can be obtained from microarray result analyses, but it is important to find, within high throughput data, the best points regarding the biological system under investigation: in our case (1) *V. vinifera* defense induction by *P. chlamydospora* and (2) *V. vinifera* induced resistance by *P. oligandrum*. Differences among treatments at the level of induction for the most important DE genes and statistically significant functional categories related to ISR (hormones, secondary metabolites, transcription factors, stress related genes) were expected. These results were clearly found when genes were considered as common to all treatments, rather than genes specific to each treatment. Our analysis compares the expression of genes at 0-dpi against 14-dpi and for most functional categories important in the establishment of priming, over-expression takes place at 0-dpi.

In all conditions where wounding occurs (mock inoculation and *P. chlamydospora* infection) the functional category presenting the strongest statistical significance is "secondary metabolism". More detailed analyses reveal that several genes involved in phenylpropanoid biosynthesis (Fig. 3a) present over-expression at 0-dpi (green genes) in the different treatments. Within these genes are four Phenyl-alanine-Ammonia Lyase genes (PAL), one gene for 4-coumarate-CoA ligase (4CL) and three cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD). One of the CAD genes was highly over-expressed at 0 dpi in plants treated with both microorganisms. The second functional category presenting a strong over-expression to the treatments, at 0-dpi, concerns the genes related to the multigenic family stilbene synthase (Fig. 3b). Interestingly, the over-expression of these genes at 0-dpi is reduced by the presence of *P. oligandrum* at the root level.

The "hormones" functional category was statistically significant for all treatments considered and the jasmonate functional category has the largest number of DE genes (51) in the case of plants inoculated by *P. oligandrum* and *P. chlamydospora*. Selected genes common to all treatments are presented in Fig. 3c and we observed two genes particularly over-expressed at 0-dpi only in the presence of *P. oligandrum* and *P. chlamydospora*: one gene involved in ethylene hormone regulation ($\text{Log}_2(\text{FC})$ of -5.23), and one gene annotated as allene oxide cyclase ($\text{Log}_2(\text{FC})$ of -6.12) involved in the jasmonate biosynthesis pathway. Seven other genes of the jasmonate biosynthetic pathway were induced at 0-dpi at various

levels: one for lipoxygenase, two for allene oxide synthase and four related to 12 oxo-phytodienoic acid reductase, confirming the strong involvement of the jasmonate pathway in *P. oligandrum* induction of plant defenses.

Two other functional categories, stress-related genes and transcription factor (Fig. 4a and 4b), presented induction of numerous genes in all treatments at 0-dpi again (all the genes are in green). In the case of stress-related genes, induction of abiotic (heat shock proteins, wounding), and biotic related genes (pathogenesis-related proteins, receptors) was detected but with slight differences according to the treatment. In the case of transcription factors, *P. oligandrum* plus *P. chlamydospora* treatment showed globally a higher genes induction at 0-dpi compared to the other treatments. And more clearly for the most represented family, Apetala2-Ethylene responsive element binding protein (AP2-EREBP) with several genes that showed a stronger induction in the presence of the *P. oligandrum* + *P. chlamydospora*.

Study of grapevine and P. chlamydospora responses by RNAseq

RNAseq experiments were designed for the comparison of samples treated with the pathogen *P. chlamydospora* in the presence or not of the BCA *P. oligandrum*, 14 days after pathogen infection. The effect of the presence of *P. oligandrum* was sought after at the transcriptional level both for the plant and the pathogen. Hence, the resulting sequences were subjected to assembly towards the *V. vinifera* genome and the *P. chlamydospora* draft genome in two different analysis procedures. Overall, as expected, most sequences belonged to the plant but a non-negligible part of the obtained sequences were of fungal origin.

The grapevine genome version used for RNAseq mapping contains 29971 different transcripts of which 24565 (81%) were detected: 702 present only in the pathogen treatment, 972 present only in the pathogen/BCA treatment, the remaining (22891 genes) present in both treatments (Fig. 5). The genes present in both treatments are either over-expressed in the pathogen treatment (11509) or in the pathogen/BCA treatment (11382). Within these 22891 genes, 1549 (7%) present a differential expression considered as significant ($P < 0.05$) by our analysis using the CuffLink software.

The *P. chlamydospora* genome used in our analysis is a draft comprising 7279 genes annotated on a BlastP analysis (Antonielli *et al.*, 2014). We detected a relatively high number of transcripts (2347 - 32% of the total predicted genes) in our RNAseq data: 1130 different transcripts in both treatments, 754 transcripts specific of the pathogen/BCA treatment and 463

transcripts in the pathogen treatment only (Fig. 5). Within sequences detected in both treatments, 573 are over-expressed and 557 are under-expressed in the pathogen/BCA treatment. A more detailed annotation was undertaken in order to obtain more information about the biological meanings of our RNAseq data.

Biological significance on the grapevine side

Using Mapman to extract the biological significance of our RNAseq grapevine data, several functional categories appear over-represented (Additional data Fig. S3). The category "stress biotic receptors" shows the highest statistical significance (P value of 3.5×10^{-6}) with a large (44 out of 46) number of over-expressed genes in the pathogen treatment whereas the "stress biotic PR protein" category (P value of 2.19×10^{-3}) presents its highest expression in the pathogen/BCA treatment with 19 genes over-expressed for a total of 21 expressed genes. The functional category "secondary metabolism lignin biosynthesis" (P value of 5.62×10^{-4}) and "secondary metabolism flavonoid" (P value of 1.57×10^{-3}) are both over-represented with a higher expression in the pathogen/BCA treatment.

Biological significance on the P. chlamydospora side

P. chlamydospora proteome annotation

The peptide fasta file provided (Antonielli *et al.*, 2014) was used to obtain more precise annotations concerning the presence of carbohydrate-active enzymes (CAZymes), and also of peptides involved in secondary metabolites production. These results were combined with results from the RNAseq statistical analyses.

P. chlamydospora genes differential expression

Genes potentially involved in secondary metabolites production and detected in our experiment are given in Fig. 6. The "antismash" analysis found genes clusters involved in terpene synthesis, five in non-ribosomal peptide synthesis (nrps), seven attributed to type I polyketid synthases (t1pks). Within RNAseq data, five sequences were found expressed in both treatments (pathogen/BCA and pathogen) of our experimental system and these belong to t1pks clusters; four are expressed at a higher level in the pathogen/BCA treatment. Genes expressed only in the pathogen/BCA treatment belong to the nrps, t1pks, terpene and nrps-t1pks hybrid clusters, whereas genes expressed only in the pathogen treatment are restricted to the terpene and nrps-t1pks hybrid clusters.

Genes annotated as CAZymes, a gene family implicated in the degradation of plant polysaccharide, was detected in our sampled (Table 1). The majority of sequences predicted in the *P. chlamydospora* genome belongs to the Glycoside Hydrolases (GH) families (345), 107 sequences to Carbohydrate Esterase (CE) families, 4 sequences to the Polysaccharide Lyases (PL) families, 268 to the GlycosylTransferases (GT) families, and 141 to the Carbohydrate-binding module (CBM) families. Among these 921 sequences identified as CAZymes, 142 are potentially secreted (SignalP positive) and mainly the GH families.

In our experiment, several CAZymes were founded in the two conditions studied, *P. chlamydospora* and *P. chlamydospora* + *P. oligandrum*. Globally, the highest number of expressed genes occurs in the pathogen/BCA treatment (279 vs 230 genes). Among CAZymes detected, 27 and 29 genes are potentially secreted respectively in *P. chlamydospora* and *P. chlamydospora* + *P. oligandrum* treatment. Interestingly, the number of genes expressed was different according to the condition. In *P. chlamydospora* + *P. oligandrum* sampled, the number of GH expressed is higher than in *P. chlamydospora* treatment (70 vs 60 respectively). On the contrary, for the same family, the number of secreted genes is higher in *P. chlamydospora* than in *P. chlamydospora* plus *P. oligandrum*. The CAZymes genes expression is modified in the presence of the BCA.

Genes potentially involved in the regulation of metabolic processes in *P. chlamydospora* were searched within BlastP annotations (against NCBI nr database) and their potential identifications were further tentatively confirmed by BlastP analysis against a Uniprot fungi database. The target genes of this analysis, that were found in the *P. chlamydospora* genome and were found expressed in the RNAseq dataset, are given in Fig. 7. A total of 34 genes were found expressed in our RNAseq dataset. Among these, 19 are present in both treatments and 22 are expressed at a higher rate in the pathogen/BCA treatment. Within these genes, one family of protein kinases (Wsc), represented by four different genes, showed a higher expression for all its family members. All genes grouped in the "Inter-species communication" functional category were expressed at a higher level in the pathogen/BCA treatment. Seven genes out of 11 from the "Invasive growth" functional category were expressed at a higher level in the pathogen/BCA treatment. Expression of one gene specifically involved in the "stress response" function (Ish1) was present at a higher level in the pathogen/BCA treatment. Within these genes involved in the regulation of cellular processes in fungi, the ones presenting the highest level of expression (above 2000 FPKM)

are involved in redox status (HapC), invasive growth (McmA), glucose regulation (Gpr1) and presented their highest expression levels with the pathogen treatment.

Discussion

P. oligandrum, an oomycete that naturally colonizes the roots of grapevines in vineyards (Gerbore *et al.*, 2014b), is well known for its abilities to protect plants (Rey *et al.*, 2008; Benhamou *et al.*, 2012; Gerbore *et al.*, 2014a). In the present study, it was used to protect Cabernet Sauvignon vine cuttings against *P. chlamydospora* attacks (50% of necrosis reduction), under greenhouse conditions, by inducing-plant defence reactions. When plants were pre-treated with *P. oligandrum*, Yacoub *et al.* (2016) demonstrated that 6 genes associated with different pathways were more induced in the stem, in response to *P. chlamydospora* infection. The mechanism of action was associated with priming and the induced resistance. The set of genes previously used by these authors, was first employed to characterize grapevine leaf responses against downy and powdery mildews attacks (Dufour *et al.*, 2013) but, as that set was not specific to the *P. oligandrum*, *V. vinifera* and *P. chlamydospora* interactions, the aim of this study was to investigate further and deepen the findings of Yacoub *et al.* (2016). High-throughput transcriptional analyses (microarray and RNAseq) were carried out to highlight differences between treatments at gene expression level in the stem. Investigation into categories involved in ISR were also carried out.

Grapevine global molecular responses were studied by microarray between 0- and 14-dpi at stem level. *P. oligandrum* colonized roots, and wood samples showed a limited number of DE genes (189) compared to control plants. To the best of our knowledge, this result represents the first dataset presenting high-throughput analyses to investigate transcriptional changes in the wood tissues of a perennial species induced by a BCA inoculated at root level. Analysis of expression profiles revealed that *P. oligandrum* treatment directly affected the expression of certain grapevine genes; for instance, genes related to ISR were modulated. Genes related to hormone synthesis regulation, one cytokinin, two ethylene, one gibberelin and one salicylic acid, and certain transcription factors, three AP2/EREBP and one bHLH, were more induced at 0 dpi (7 days after the first *P. oligandrum* inoculation), except for the bHLH gene and cytokinin one, which were more induced at 14 dpi (21 days after the first *P. oligandrum* inoculation). Modulated transcription factor genes are involved in JA and ET signalling pathways. Our results also showed that two genes involved in ethylene synthesis regulation were more induced at 0 dpi, but that no gene implicated in the JA pathway was detected when the BCA was inoculated. These results were in agreement with previous studies showing that *P. oligandrum* induction of resistance is associated with JA/ET-pathway modulations (Hase *et al.*, 2006, 2008)

Plant resistance induced by beneficial microorganisms has been associated with faster and/ or stronger activation of defence responses after pathogen inoculation (Conrath *et al.*, 2006; Pieterse *et al.*, 2014). Yacoub *et al.* (2016) showed that necrosis of grapevine cuttings caused by *P. chlamydospora* was reduced by half when *P. oligandrum* colonized the root system. In this study, the reduction of *P. chlamydospora* necroses was shown to be related to complex transcriptional changes in plants: (i) mock-inoculated, (ii) infected with *P. chlamydospora* and (iii) pre-treated with the BCA before being infected with the pathogenic agent. In order to understand the effect of *P. oligandrum* on *P. chlamydospora*-infected plant responses, the expression levels of ISR-related genes involved in plants inoculated with the pathogen, the BCA, or the two microorganisms, were compared. For instance, in plants pre-treated with *P. oligandrum*, more intense transcriptional changes took place when pathogen infection occurred (1858 DE genes), and enhanced grapevine responses to *P. chlamydospora* infection were also observed.

Regarding, the genes involved in phenylpropanoid synthesis pathways, one gene encoding CAD was strongly induced, when plants were pre-treated with the BCA, in response to the pathogen attack. The role of this enzyme, which is involved in the lignin pathway, consists in transforming the *p*-coumaraldehyde (molecule derived from phenylalanine) to *p*-coumarylic alcohol, which is defined as a lignin polymer. We can hypothesize that the presence of *P. oligandrum* at root level, enhanced the ability of the plant to reinforce its cell-walls *via* lignin accumulation. No major differences were observed in expression levels of genes encoding the stilbene synthase (STS) family between treatments. These results were different to those obtained by Perazzoli *et al.* (2012) which showed that, on grapevine leaves, 4 genes encoding STS were more induced in plants treated with *Trichoderma harzianum* T39 and *Plasmopara viticola*, than in those only infected with the pathogen. Differences between the microorganisms, the specific plant organs that were studied and the sampling times, could explain the differences observed.

Analysis of expression profiles revealed that certain genes involved in JA/ET-pathways are more expressed in plants treated with both the BCA and the pathogen, than in those only infected with *P. chlamydospora*. Several studies have demonstrated the implication of JA/ET-signalling pathways in *P. oligandrum*-induced resistance (Hase *et al.* 2006, 2008; Ouyang *et al.*, 2015; Wang *et al.* 2011). We also observed this modulation of JA/ET-pathways in our study. Defence signals, specifically activated in *P. oligandrum*-treated plants in response to *P. chlamydospora* attacks, included those associated with ET (two ACC synthase,

one involved in ethylene hormone regulation, six AP2/ERBF genes) and JA (one Allene oxide cyclase and 4 bHLH genes). All these grapevine genes, ACC synthase, Allene oxide cyclase and AP2-ERBP transcription factors, represent a valuable tool in the characterization of the tri-partite interaction between *P. oligandrum*, *V. vinifera* and *P. chlamydospora*. These genes are not the same as those used in the exploration of host-pathogen interactions performed by Yacoub *et al.* (2016) to characterize the same interaction, or by Dufour *et al.* (2013), to characterize interactions with grapevine mildews.

Among these genes, one ACC synthase, *i.e.* the Allene oxide cyclase, one bHLH and three AP2/ERBF, was strongly induced in *P. oligandrum*-pre-treated plants, which seems to be important in induction of plant resistance. Pré and co-workers (2008) demonstrated that an AP2/ERBF gene (ORA59) is an essential integrator of the JA and ET-signalling pathways. They showed that the overexpression of ORA59 induces resistance against *Botrytis cinerea*, but that ORA59 mutant plants were more susceptible. In our study, we observed a higher induction of transcription factors genes of the AP2/ERBF family in plants treated with the BCA and infected with the pathogen, compared to the other treatments. More detailed time course studies should allow better characterization of the modulation kinetics of these genes during the development of the wood disease.

Microarray analyses showed that as *P. oligandrum* acted in *V. vinifera* as an inducer of priming and systemic resistance, it constitutes a valuable starting point for the grapevine global response characterization of the tri-partite interaction between *P. oligandrum*, *V. vinifera* and *P. chlamydospora*.

The characterization of the host-pathogen relationship often focuses on the plant responses, in order to find genes which might be amenable to genetic manipulation and to conferring resistance to the pathogen. Characterization of the genes expressed by the pathogen, especially those involved in the colonization of the host and effectors, which may be host-specific, is of the utmost importance. Increasingly sensitive genomic technologies are being used to characterize the host and the pathogen transcriptomes in the same sample (Westermann *et al.*, 2012), despite the limited pathogen-related data inherent to the low number of pathogen molecular species related to the host molecular species.

In the present study, we choose to use a ribo-zero depletion strategy in our sampled of grapevine wood to detect plant and *P. chlamydospora* transcripts. The results were encouraging, as we recovered 2347 different transcripts out of a total of 7279 genes from the

recently sequenced *P. chlamydospora* genome (Antonnielli *et al.*, 2014; Morales-Cruz *et al.*, 2015). Interestingly, our results showed that, among these *P. chlamydospora*-recovered transcripts, 463 transcripts were only identified in plants treated with the pathogen, a higher number of transcripts, 754, being exclusively detected in plants treated with the two microorganisms. Thus, the presence of *P. oligandrum*, at plant root level, indirectly affected *P. chlamydospora* transcriptomic responses.

The *P. chlamydospora* protein sequences were used for specific annotation of the CAZymes, secreted proteins, and secondary metabolism clusters. The annotations obtained provide enhanced information about the genes expressed during grapevine infection by the pathogen, in the presence or not of *P. oligandrum*.

Numerous studies have shown that *P. chlamydospora* produces several secondary metabolites with phytotoxic activity (i.e. toxins) (Andolfi *et al.*, 2011; Bruno & Sparapano 2006a,b; Bruno *et al.*, 2007; Luini *et al.*, 2010). So far, genes involved in *P. chlamydospora* secondary metabolite synthesis have not been identified. The specific annotations we made of the *P. chlamydospora* protein sequences, showed that the 19 gene clusters of secondary metabolites obtained were associated with polyketides (t1pks), terpenes and non-ribosomal peptides (nrps). These results are in agreement with those reported by Morales-Cruz *et al.* (2015), which showed that many secondary metabolite clusters were found in the ascomycete trunk pathogens.

It is noteworthy that a large number of secondary metabolism clusters, 11, have been found in our dataset. The genes encoding for these enzymes were either expressed in both tested treatments (t1pks), or else specific to one treatment (t1pks and NRPS in the case of the pathogen/BCA treatment, NRPS only in the case of the pathogen treatment). When *P. oligandrum* colonized plant roots, three *P. chlamydospora* sequences encoding NRPS were not expressed. These results are useful, because it has been reported that NRPS may be responsible for the synthesis of toxic polypeptides (Andolfi *et al.*, 2011; Luini *et al.*, 2010). Most *t1pks* genes were more over-expressed when *P. oligandrum* was present at the root level. These proteins could participate in the production of naphthalenone pentaketide toxins found in *P. chlamydospora* liquid culture. These results showed the indirect effect induced by *P. oligandrum* on pathogen secondary metabolite productions. We can hypothesize that this potential production of particular toxins corresponds to a stress state of the pathogen.

CAZymes are proteins that catalyze the breakdown, biosynthesis or modification of carbohydrates and glycoconjugates (Cantarel *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2014). CAZymes are grouped into six functional classes. Specific annotation of *P. chlamydospora* protein sequences revealed that there were 923 genes encoding the different CAZymes. Among them, we identified 142 CAZymes that are potentially secreted (signalP). Again, these results agreed with those obtained by Morales-Cruz *et al.* (2015). In our dataset, low number of these enzyme transcripts were detected. These results may be due to the low amount of pathogen mRNA compared to the mRNA found in the plant. Nevertheless, differences in CAZYme gene level expressions and protein secretions between treatments were observed. The GHs that were involved in the degradation of cellulose and hemicelluloses were less highly secreted in the presence of the BCA. However, the GTs responsible for the biosynthesis glycosidic bonds from phospho-activated sugar donors (Yip & Withers, 2006), were more secreted when *P. oligandrum* was present at plant root level. It could be supposed that the pathogen is stressed in plants which being treated with *P. oligandrum* is unable to progress *in planta*, and needs to secrete enzymes in order to find a source of energy. Overall, these results confirmed the indirect effect of *P. oligandrum* root inoculation on *P. chlamydospora* metabolism at stem level.

In our RNAseq, we also found transcripts of several proteins known to be important for the pathogen-host relationship, namely transcription factors and protein kinases (Turrà *et al.*, 2014, Brakhage, 2013). We were able to find homologs to previously described proteins known for their involvement in specific physiological processes. Several of these proteins presented a higher level of expression in the pathogen/BCA condition (ex: Ish1, Wsc family, Swi6). This could be due to *P. oligandrum*, which may induce some stresses on *P. chlamydospora* via the production of effectors able to reach the pathogen through the host vascular system. Other *P. chlamydospora* genes possibly involved in invasive growth, McmA, Ste7, Ste20 and Sho1, presented a strong reduction of expression in the presence of *P. oligandrum*. These four genes were those with the highest expression levels in the pathogen treatment, 2952, 526, 261 and 1123 FPKM, respectively. Such reduction of gene expressions, together with other factors, may be involved in the reduction of the wood necroses caused by *P. chlamydospora*, which was associated with *P. oligandrum* root colonization in our experimental conditions.

Overall, our data showed that *P. oligandrum* acted as a systemic resistance inducer, and promoted the JA/ET signalling pathway. After pathogenic attacks, the level expression of certain genes involved in the JA/ET-signalling pathways were more induced when plants were pre-treated with the BCA, thus highlighting a priming effect for certain genes. The indirect effect of the oomycete on *P. chlamydopora* metabolism was demonstrated, which contributes to better understanding of the protection mechanisms observed in a preliminary study (Yacoub *et al.*, 2016). Further investigations will be conducted on studying the genes specific to this tri-partite interaction, in order to validate their use as disease-resistance indicator, and will also be tested on other pathogens involved in the Esca disease.

Acknowledgements

We would like to thank the French Ministry of Agriculture (V1302 Casdar research project on Grapevine Trunk Diseases), the Poupelain Foundation, the Tunisian Ministry of Scientific Research and Biovitis for their financial support.

We appreciate the technical support provided by: the Toulouse Get Biopuce Platform for microarray experiments (Dr V. LeBerre, Ms L. Trouilh, A. Jouanillou and S. Lamarre); the Strasbourg IGBMC platform (Dr B. Jost, Ms C. Keime and A. Velt) concerning RNAseq experiments; the Toulouse GenoToul bioinformatics facility (Ms. M.S. Trotard) for advice about bioinformatic analyses on the server, and the Bordeaux Functional Genomics Platform (Mr. J. Petit) for the RNA quality controls.

References

- Andolfi L, Mugnai L, Luque J, Surico G, Cimmino A, Evidente A. 2011.** Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. *Toxins* **3**: 1569–1605.
- Antonielli L, Compant S, Strauss J, Sessitsch A, Berger H. 2014.** Draft Genome Sequence of *Phaeomoniella chlamydospora* Strain RR-HG1, a Grapevine Trunk Disease (Esca)-Related Member of the Ascomycota. *Genome announcements* **2**: 2013–2014.
- Benhamou N, le Floch G, Vallance J, Gerbore J, Grizard D, Rey P. 2012.** *Pythium oligandrum* : an example of opportunistic success. *Microbiology* **158**: 2679–2694.
- Bertsch C, Ramírez-Suero M, Magnin-Robert M, Larignon P, Chong J, Abou-Mansour E, Spagnolo A, Clément C, Fontaine F. 2013.** Grapevine trunk diseases: Complex and still poorly understood. *Plant Pathology* **62**: 243–265.
- Blanco-Ulate B, Rolshausen PE, Cantu D. 2013a.** Draft Genome Sequence of the Grapevine Dieback Fungus *Eutypa lata* UCR-EL1. *Genome announcements* **1**: 5–6.
- Blanco-Ulate B, Rolshausen P, Cantu D. 2013b.** Draft Genome Sequence of the Ascomycete *Phaeoacremonium aleophilum* Strain UCR-PA7 , a Causal Agent of the Esca Disease. *Genome Announcement* **1**: 3–4.
- Brakhage AA. 2013.** Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature reviews Microbiology* **11**: 21–32.
- 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 response to the pathogens in calli. *Physiological Molecular and Plant Pathology* **69**: 182–194.
- 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 Molecular and Plant Pathology* **69**: 195–208.
- 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 Molecular and Plant Pathology* **71**: 106–124.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. 2009.** The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Research* **37**: 233-238.
- Carvalho BS, Irizarry RA. 2010.** A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics* **26**: 2363–2367.

- Cheng Z, Sun L, Qi T, Zhang B, Peng W, Liu Y, Xie D. 2011.** The bHLH transcription factor MYC3 interacts with the Jasmonate ZIM-domain proteins to mediate jasmonate response in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **4**: 279 – 288.
- Conrath U, Beckers GJM, Flors V, García-Agustín P, Jakab G, Mauch F, Newman MA, Pieterse CMJ, Poinssot B, Pozo MJ, et al. 2006.** Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant – Microbe Interactions* **19**: 1062 – 1071.
- Dufour MC, Lambert C, Bouscaut J, Mérillon JM, Corio-Costet MF. 2013.** Benzothiadiazole-primed defence responses and enhanced differential expression of defence genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology* **2**: 370–382.
- Fernandez-Calvo P, Chini A, Fernandez-Barbero G, Chico JM, Gimenez-Ibanez S, Geerinck J, Eeckhout D, Schweizer F, Godoy M, Franco-Zorrilla JM, et al. 2011.** The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell* **23**: 701 – 715.
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, et al. 2004.** Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology* **5**: R80.
- Gerbore J, Benhamou N, Vallance J, Le Floch G, Grizard D, Regnault-Roger C, Rey P. 2014a.** Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environmental science and pollution research international* **21**: 4847–4860.
- Gerbore J, Vallance J, Yacoub A, Delmotte F, Grizard D, Regnault-Roger C, Rey P. 2014b.** Characterization of *Pythium oligandrum* populations that colonise the rhizosphere of vines from the Bordeaux region. *FEMS microbiology ecology* **90**:153-67
- Hase S, Shimizu A, Nakaho K, Takenaka S, Takahashi H. 2006.** Induction of transient ethylene and reduction in severity of tomato bacterial wilt by *Pythium oligandrum*. *Plant Pathology* **55**: 537–543.
- Hase S, Takahashi S, Takenaka S, Nakaho K, Arie T, Seo S, Ohashi Y, Takahashi H. 2008.** Involvement of jasmonic acid signalling in bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. *Plant Pathology* **57**: 870–876.
- Kauffmann A, Gentleman R, Huber W. 2009.** arrayQualityMetrics - A bioconductor package for quality assessment of microarray data. *Bioinformatics* **25**: 415–416.
- Knoester M, Pieterse CMJ, Bol JF, Van Loon LC. 1999.** Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Mol. Plant-Microbe Interaction*. **12**: 720–727.

- 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**: 32–46.
- Le Floch G, Vallance J, Benhamou N, Rey P. 2009.** Combining the oomycete *Pythium oligandrum* with two other antagonistic fungi: Root relationships and tomato grey mold biocontrol. *Biological Control* **50**: 288–298.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sánchez-Serrano JJ, Solano R. 2003.** Ethylene response factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* **15**: 165–178.
- Luini E, Fleurat-Lessard P, Rousseau L, Roblin G, Berjeaud JM. 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**: 403–411.
- Memelink J. 2009.** Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry* **70**:1560–1570.
- Mohamed N, Lherminier J, Farmer M, Fromentin J, Béno N, Houot V, Milat M, Blein J. 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**: 611-620.
- Morales-Cruz A, Amrine KCH, Blanco-Ulate B, Lawrence DP, Travadon R, Rolshausen PE, Baumgartner K, Cantu D. 2015.** Distinctive expansion of gene families associated with plant cell wall degradation, secondary metabolism, and nutrient uptake in the genomes of grapevine trunk pathogens. *BMC Genomics* **16**: 469.
- Niu Y, Figueroa P, Browse J. 2011.** Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **62**: 2143 – 2154.
- Ouyang Z, Li X, Huang L, Hong Y, Zhang Y, Zhang H, Li D, Song F. 2014.** Elicitor-like proteins Oli-D1 and Oli-D2 from *Pythium oligandrum* trigger hypersensitive response in *Nicotiana benthamiana* and induce resistance against *Botrytis cinerea* in tomato. *Molecular Plant Pathology* **16** : 238–250.
- Perazzolli M, Moretto M, Fontana P, Ferrarini A, Velasco R, Moser C, Delledonne M, Pertot I. 2012.** Downy mildew resistance induced by *Trichoderma harzianum* T39 in susceptible grapevines partially mimics transcriptional changes of resistant genotypes. *BMC Genomics* **13**: 660.
- Pieterse CMJ, Van Wees SCM, Van Pelt JA, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeek PJ, van Loon LC. 1998.** A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**:1571–1580.

- Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM, Bakker P a HM. 2014.** Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual review of phytopathology* **52**: 347–375.
- Pré M, Atallah M, Champion A, De Vos M, Pieterse CMJ, Memelink J. 2008.** The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiology* **147**:1347-1357.
- Pritchard L, Birch P. 2011.** A systems biology perspective on plant-microbe interactions: biochemical and structural targets of pathogen effectors. *Plant science* **180**: 584–603.
- Rey P, Benhamou N, Tirilly Y. 1998.** Ultrastructural and cytochemical investigation of asymptomatic infection by *Pythium* spp. *Phytopathology* **88**: 234–244.
- Rey P, Gl F, Benhamou N, Tirilly Y. 2008.** *Pythium oligandrum* biocontrol: its relationships with fungi and plants. In: Ait Barka E, Clément C (eds) Plant–microbe interactions. Research Signpost, Kerala, pp 43–67.
- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJB, Moorman a FM. 2009.** Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic acids research* **37**: e45.
- Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, et al. 2003.** TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques* **34**: 374–378.
- Sasaki-Sekimoto Y, Jikumaru Y, Obayashi T, Saito H, Masuda S, Kamiya Y, Ohta H, Shirasu K. 2013.** Basic helix-loop-helix transcription factors JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 are negative regulators of jasmonate responses in Arabidopsis. *Plant Physiology* **163**: 291–304.
- Smyth G. 2005.** limma: Linear Models for Microarray Data. Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor. New York: Springer; 397–420.
- Spagnolo A, Magnin-Robert M, Alayi TD, Cilindre C, Mercier L, Schaeffer-Reiss C, Van Dorsselaer A, Clément C, Fontaine F. 2012.** Physiological changes in green stems of *vitis vinifera* L. cv. Chardonnay in response to esca proper and apoplexy revealed by proteomic and transcriptomic analyses. *Journal of Proteome Research* **11**: 461–475.
- Takenaka S, Tamagake H. 2009.** Foliar spray of a cell wall protein fraction from the biocontrol agent *Pythium oligandrum* induces defence-related genes and increases resistance against *Cercospora* leaf spot in sugar beet. *Journal of General Plant Pathology* **75**: 340–348.

- Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L. 2012.** Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols* **7**: 562–578.
- Turrà D, Segorbe D, Di Pietro A. 2014.** Protein Kinases in Plant-Pathogenic Fungi: Conserved Regulators of Infection. *Annual review of phytopathology* **52**: 267–288.
- Van der Ent S, Van Wees SCM, Pieterse CMJ. 2009.** Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry* **70**:1581–1588.
- Verhagen BWM, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, Van Loon LC, Pieterse CMJ. 2004.** The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 895–908.
- Wang A, Lou B, Xu T, Lin C. 2011.** Defense responses in tomato fruit induced by oligandrin against *Botrytis cinere* a. *African Journal of Biotechnology* **10**: 4596–4601.
- Westermann AJ, Gorski SA, Vogel J. 2012.** Dual RNA-seq of pathogen and host. *Nature Reviews Microbiology* **10**: 618–630.
- Yacoub A, Gerbore J, Magnin N, Chambon P, Dufour MC, Corio-Costet MF, Guyoneaud R, Rey P. 2016.** Ability of *Pythium oligandrum* strains to protect *Vitis vinifera* L., by inducing plant resistance against *Phaeoemoniella chlamydospora*, a pathogen involved in Esca, a grapevine trunk disease. *Biological control* **92**: 7–16.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. 2012.** Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**: 134.
- Yip VL, Withers SG. 2006.** Breakdown of oligosaccharides by the process of elimination. *Curr Opin Chem Biol* **10**:174-155.
- Zhao Z, Liu H, Wang C, Xu J. 2014.** Correction: comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC genomics* **15**: 6.

Table 1. CAZymes genes predicted in the *Phaeoconiella chlamydospora* genome and transcripts detected in the RNAseq samples. Within parentheses are the number of CAZymes potentially secreted (SignalP positive). Pch: *P. chlamydospora*; PoPch : *P. oligandrum* and *P. chlamydospora*.

Families	Number of genes predicted in the genome	Number of genes detected in sampled	
		Pch	PoPch
Glycoside hydrolases (GH)	345(72)	60(17)	70(9)
Glycosyl transferases (GT)	268(17)	34(3)	69(7)
Carbohydrate-binding module (CBM)	141(26)	27(6)	37(4)
Carbohydrate esterases (CE)	107(12)	13(1)	10(3)
Auxiliary Activities (AA)	56(14)	9(0)	7(2)
Polysaccharide Lyases (PL)	4(1)	2(0)	1(1)

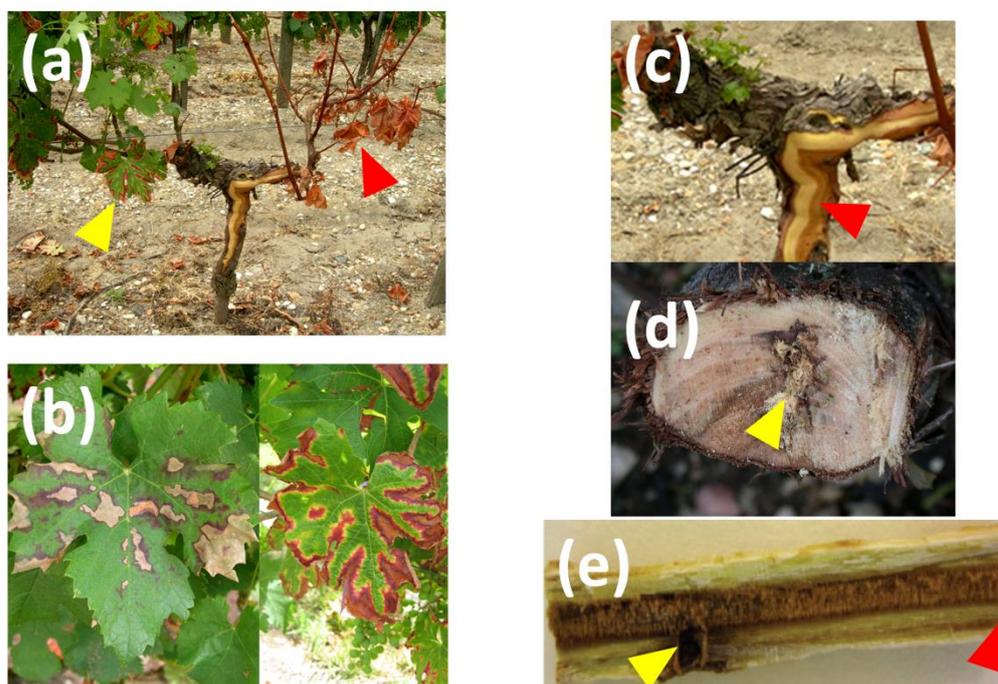


Fig. 1 Symptoms related to grapevine trunk disease (Esca). (a) Whole plant symptoms at the leaf level; yellow arrow: leaf discoloration with some drying; red arrow: completely dry arm (apoplexy). (b) Detailed symptoms at the leaf level; left, white grape cultivar; right, red grape cultivar. (c) Wood orange coloration likely corresponding to fungal mycelium infection. (d) Transverse section of an esca-infected trunk showing wood decay. (e) Longitudinal section of a typical *Phaeomoniella chlamydospora*-infected cutting (at 120-dpi) used in our experiments; yellow arrow, site of infection; red arrow, limit of progression of the fungal mycelium.

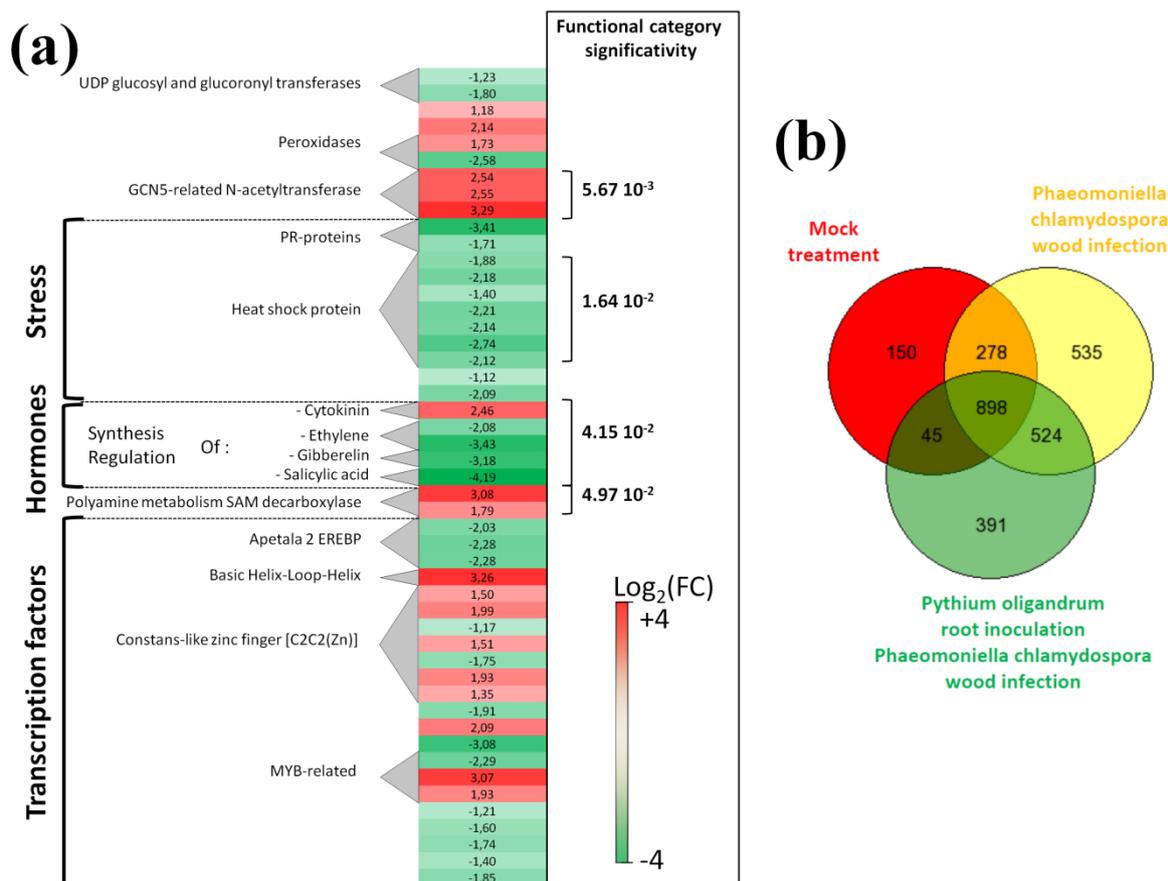


Fig. 2 Global aspects of the grapevine transcriptome evolution from 0- to 14-dpi according to the treatments. (a) Major functional categories obtained after limma analysis and Mapman classification for root-inoculated grapevine with *Pythium oligandrum* in the absence of pathogen infection. Red color means over-expression at 14-dpi and green color means over-expression at 0-dpi (b) Venn diagram showing gene numbers in grapevine wood tissues common or specific to the three conditions considered (Mock inoculation, *Phaeoconiella chlamydozpora*-wood infection, *Phaeoconiella chlamydozpora*-wood infection and *Pythium oligandrum*-root inoculation).

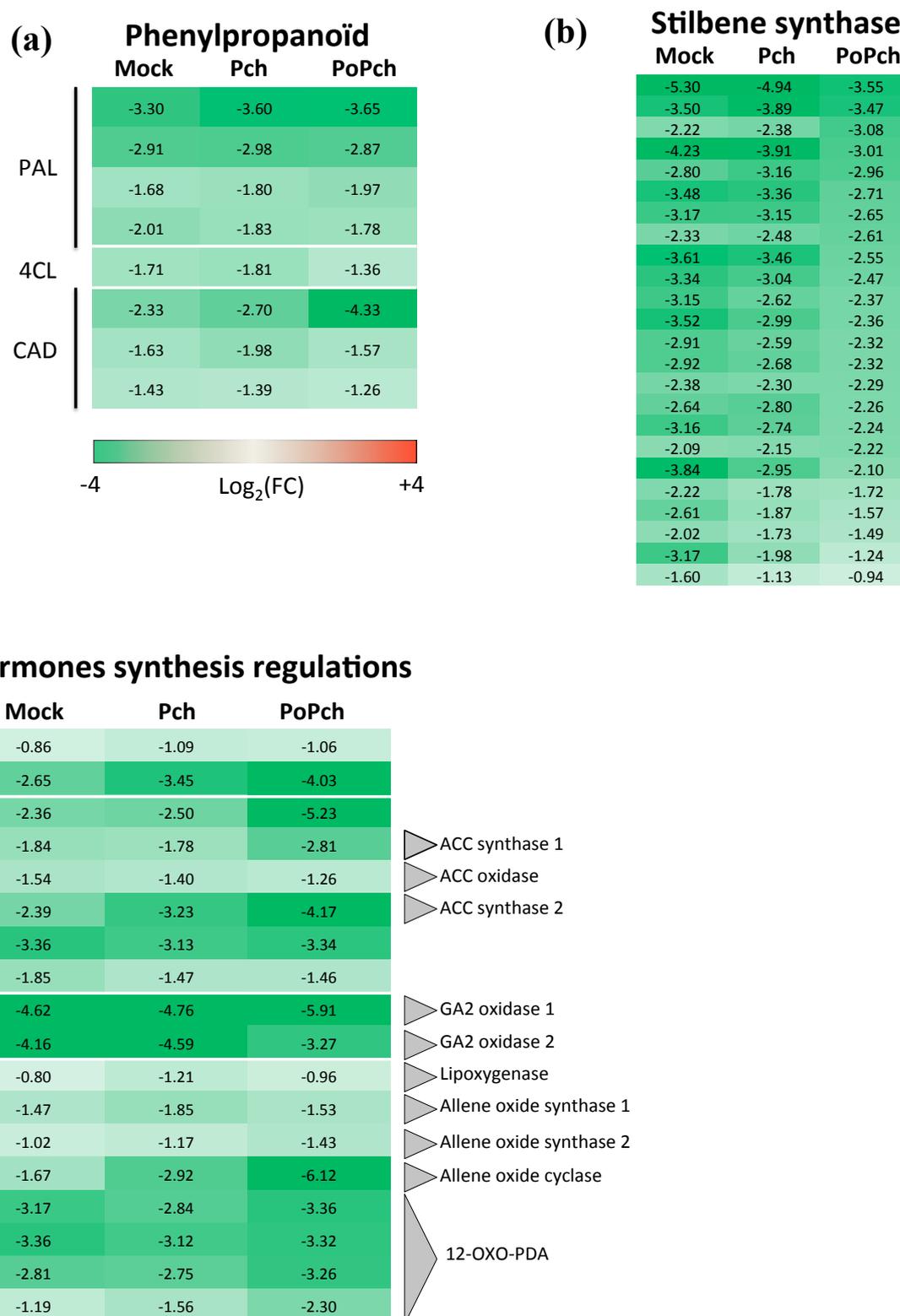


Fig. 3 Characteristics of the grapevine transcriptome evolution for genes involved in secondary metabolism between 0- and 14-dpi. Expression levels value of (a) genes encoding proteins involved in the biosynthesis of phenylpropanoïd (PAL: phenylalanine ammonium lyase, 4CL: 4-coumarate lyase, CAD: cinnamyl alcohol dehydrogenase), (b) genes encoding stilbene synthase proteins and (c) genes encoding proteins involved in the synthesis or regulation of hormones (ABA: abscissic acid, ACC: 1-aminocyclopropane 1-carboxylate, GA:

gibberellin) are given as fold change on a Log_2 basis. Red color means over-expression at 14-dpi and green color means over-expression at 0-dpi. Mock: mock inoculation; Po: *P. oligandrum*; Pch: *P. chlamydospora*; PoPch: *P. oligandrum* and *P. chlamydospora*.

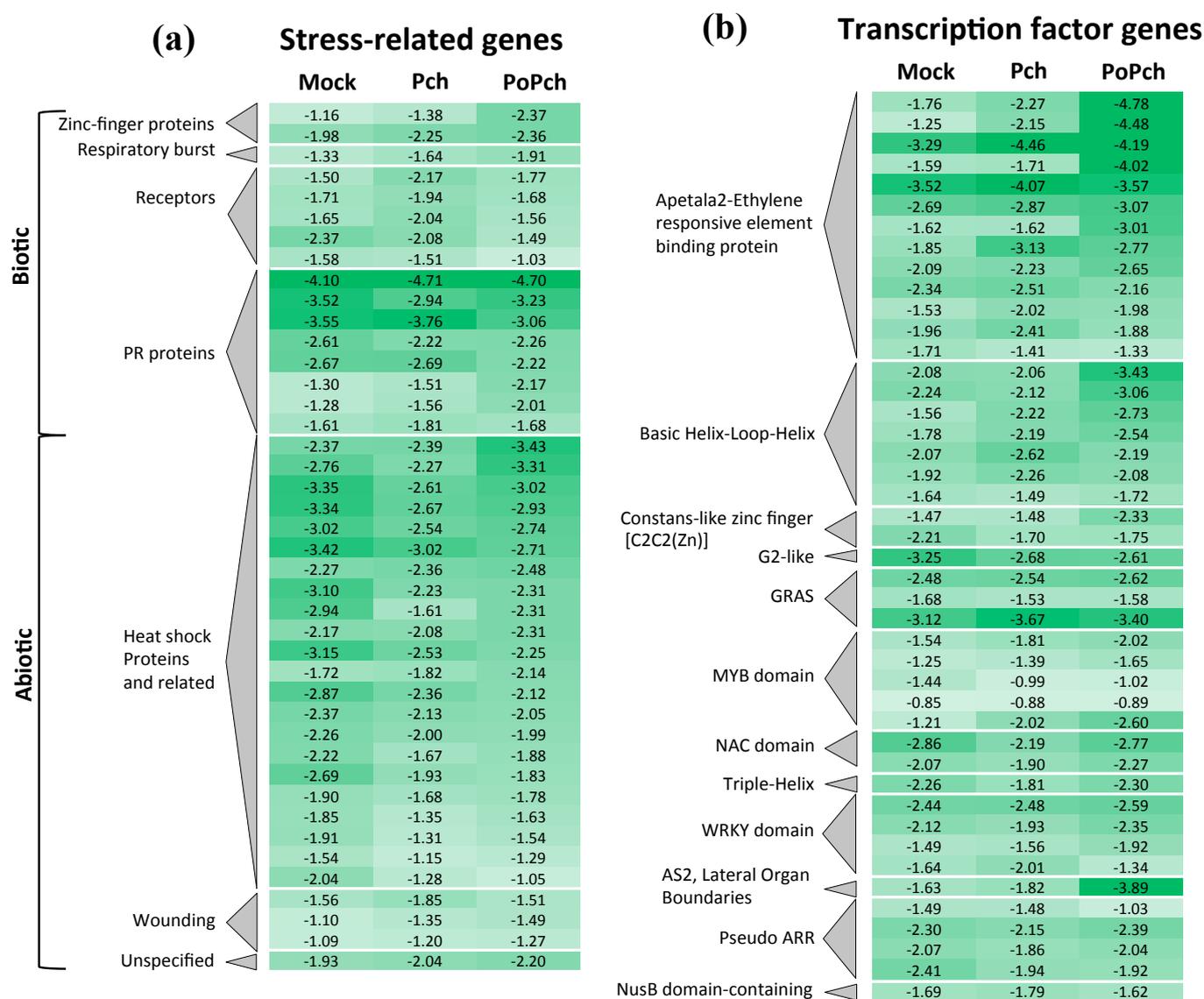


Fig. 4 Global aspects of the grapevine transcriptome evolution for stress-related genes (a) and transcription factor functional category (b) between 0- and 14-dpi. Expression levels values are given as a fold change on a Log_2 basis. Red color means over-expression at 14-dpi and green color means over-expression at 0dpi. Mock: mock inoculation; Po: *P. oligandrum*; Pch: *P. chlamydospora*; PoPch: *P. oligandrum* and *P. chlamydospora*.

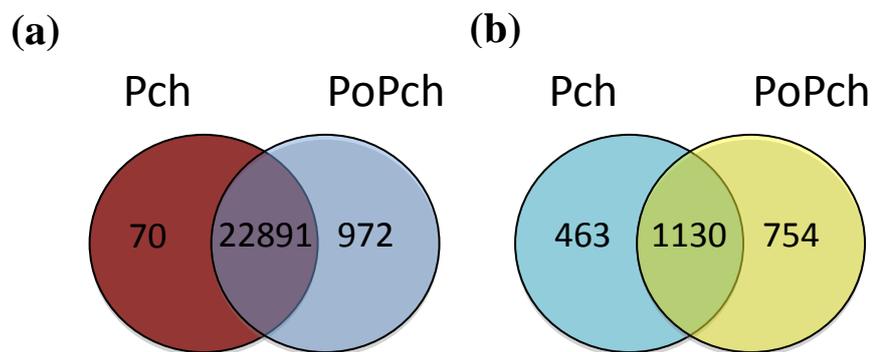


Fig. 5 Venn diagram showing numbers of *Vitis vinifera* (a) and *P. chlamydospora* (b) transcripts detected by RNAseq analysis in grapevine wood tissues according to the treatment (Pch: *P. chlamydospora*; PoPch : *P. oligandrum* and *P. chlamydospora*).

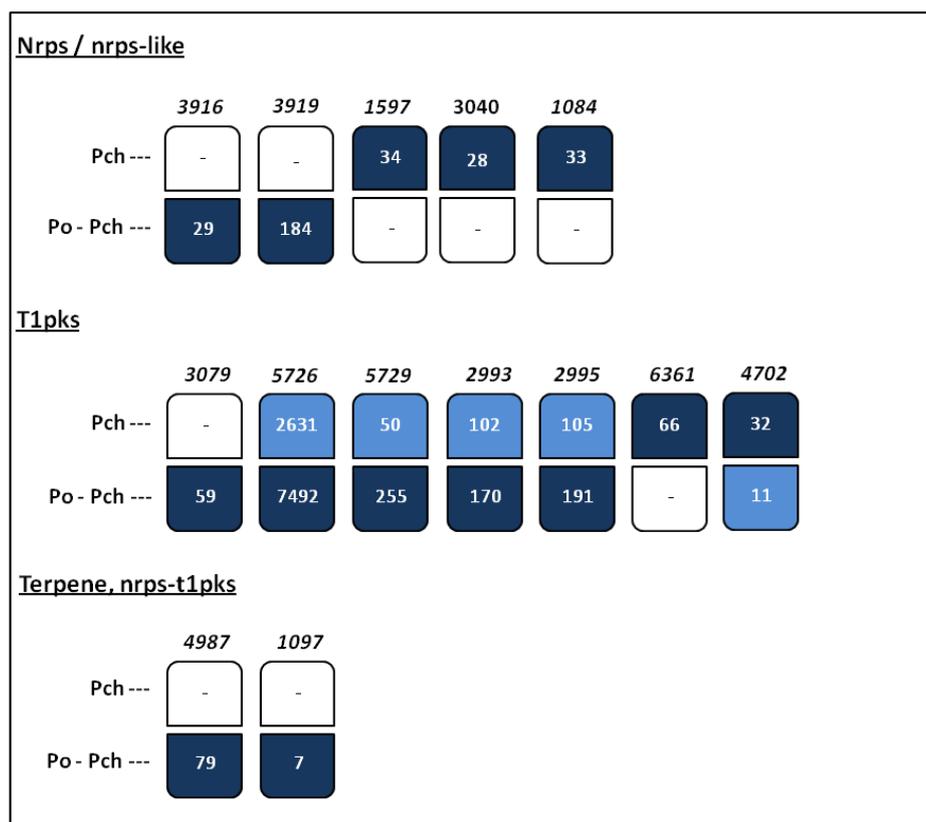


Fig. 6 Expression level of *Phaeoconiella chlamydospora* genes predicted as secondary metabolites producers obtained in RNAseq experiment. Expression levels values are given as FPKM [fragments per kilobase per million mapped fragments]). nrps = non-ribosomal peptide synthetase ; t1pks = type 1 polyketide synthase. Pch: *P. chlamydospora*; Po-Pch : *P. oligandrum* and *P. chlamydospora*. Blue color means number of gene copies is lower than in the other condition. Deep blue means the number of gene copies is higher than in the other treatment. Blank means no gene copies detected in samples.

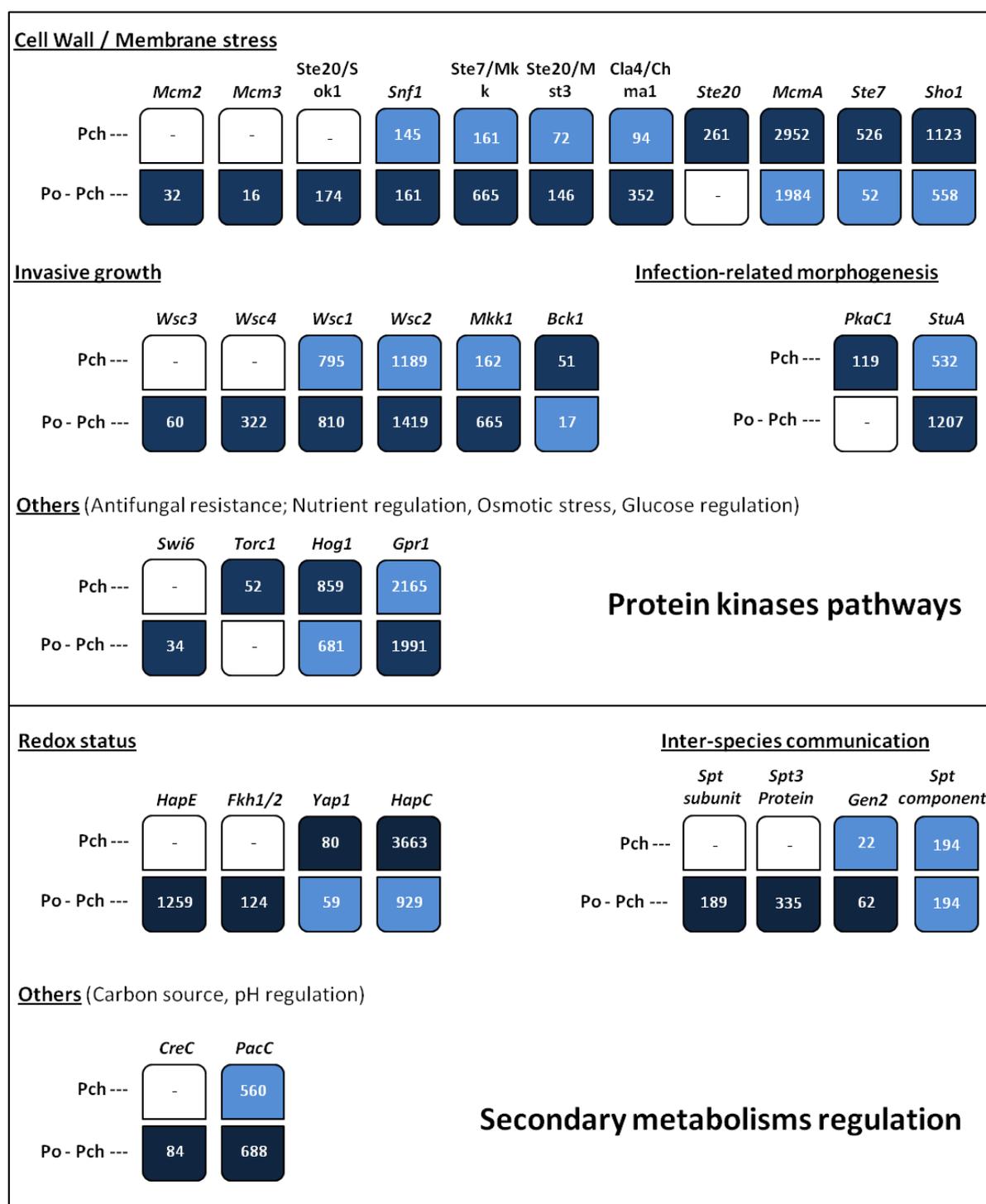


Fig. 7 Expression level of *Phaeoemoniella chlamydospora* genes involved in the regulation of fungal secondary metabolism (Brakhage, 2013), and protein kinases pathways (Turrà *et al.*, 2014), obtained in RNAseq experiment. Expression levels values are given as FPKM [fragments per kilobase per million mapped fragments]). Pch: *P. chlamydospora*; Po-Pch : *P. oligandrum* and *P. chlamydospora*. Blue color means number of gene copies is lower than in the other condition. Deep blue means the number of gene copies is higher than in the other treatment. Blank means no gene copies detected in samples.

Additional data

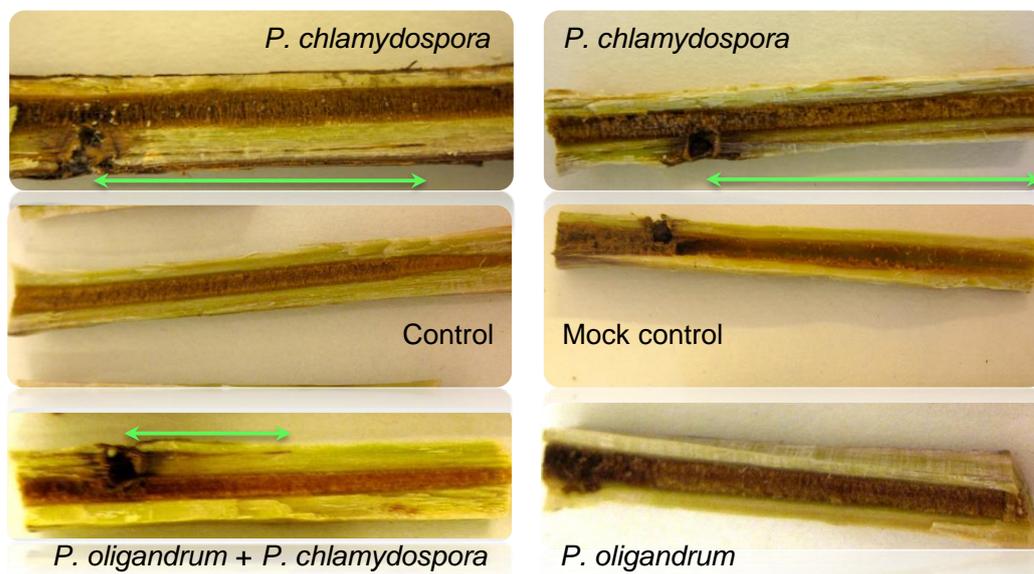


Fig. 1S Examples of samples collected and measured necroses.

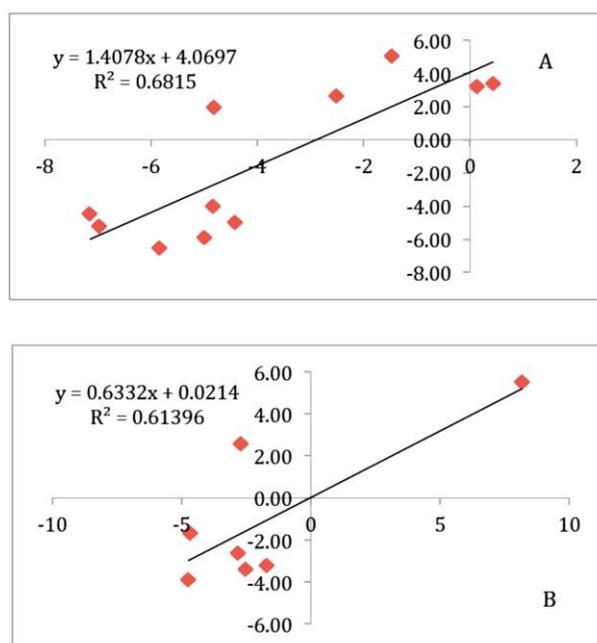
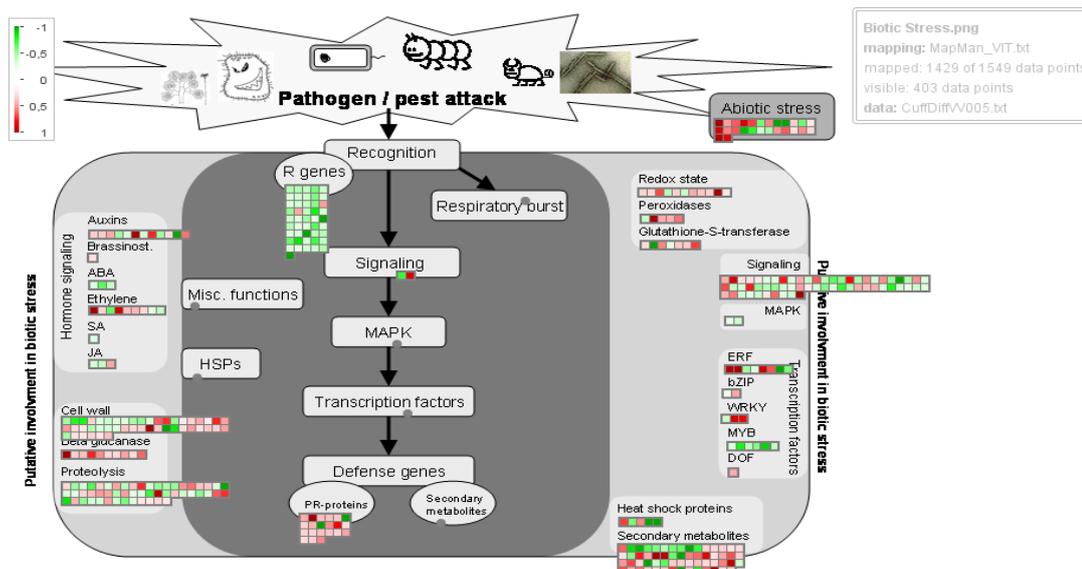


Fig. 2S Comparison of microarray and qPCR expression levels (Log₂ FC) by regression analysis. (A) Samples treated with *P. oligandrum* and *P. chlamydospora*; (B) Mock-inoculated plants. Each red point represents one studied gene (related to ABC transporter, auxin binding protein, cytochrome P450, expansin, GDSL lipase, dioxygenase (gibberelin), glycosyl transferase, auxin responsive protein, naringenin dioxygenase, polygalacturonase, terpene synthase et glycosyl transferase for the A condition / ABC transporter, allene oxyde cyclase, cytochrome P450, expansin, dioxygenase (gibberelin), auxin responsive protein, polygalacturonase, phospholipase et glycosyl transferase for the B condition).



Bin	Functional category	Number of genes	p-value
20.1.2	stress.biotic.receptors	46	3.05E-06
26.4	misc.beta 1,3 glucan hydrolases	10	1.79E-03
20.1.7	stress.biotic.PR-proteins	21	2.19E-03
20.2	stress.abiotic	26	3.21E-02
16	secondary metabolism	59	3.53E-02
26.12	misc.peroxidases	5	0.0

Fig. 3S Functional categories differentially expressed in grapevine RNAseq data and focus on the category "stress biotic receptors". P values were calculated with the Wilcoxon rank test at $p < 0.05$.

Table 1S Genes used for microarray validation by RT-qPCR.

Gene identifier* V0 - 12X V1 - 12X	Name	Mapman functional category	Sens (5'>3')	Anti-sens (3'>5')
chr11_jgvv16_101_t01 Vv11s0016g01220	Auxin binding protein	20.2.99stress.abiotic.unspecified	CAAGTGAATGGGGCTGGGAT	AAGGATCTGGAGACCAGGCT
chr18_jgvv1_77_t01 Vv18s0001g01130	Expansin	10.7cell wall.modification	GGTGGACTAAAGCTCACGCT	AATGCTGTGCTCAAAGCTGC
chr5_jgvv20_35_t01 Vv05s0020g00420	Polygalacturonase	10.6.3cell wall.degradation.pectate lyases and polygalacturonases	TCAACAATCTTCTCCGGCCC	TTCCGCTTCCTGTGAAGGTC
chr7_jgvv31_232_t01 Vv07s0031g02550	ABC transporter	34.16 transport.ABC transportersand multidrug resistance systems	TTCGTGGCTCAGAAGGACAC	ATCAACTGTGCCGAGGAAG
chr14_jgvv66_158_t01 Vv14s0066g01730	Glycosyl transferase	10.2 cell-wall.cellulose synthesis	GTCCTACATGGCTTGGCTGT	CGGGCTTCAACTTCTTGTGC
chr1_jgvv11_349_t01 Vv01s0011g03090	Allene oxide cyclase	17.7.1.4 hormone metabolism.jasmonate.synthesis degradation.allene oxidase cyclase	CTGAGTCAGAAGCCAGCCAA	CTCCAGGTCTCCGGTGTAGA
chr10_jgvv3_374_t01 Vv10s0003g04200	Phospholipase	11.9.2.1 lipid metabolism.lipid degradation.lipases.triacylglycerol lipase	TCTGGCTTCAGTTGGAGTGC	GCTGATTCCGGAGAGCTGTT

chr13_random_jgvv123 _27_t01 Vv13s0067g03700	Terpenoid Synthase	16.1.5 secondary metabolism.isopren oids.terpenoids	ATGGAGATGGGCATGGTGTC	TGACAAC TTCTAGACCAGGG G
chr18_jgvv1_338_t01 Vv18s0001g06090	Glycosyl transferase	26.2 misc.UDP glucosyl and glucoronyl transferases	GGCCTTGGAGTGGAAGACTC	TCGCTGAGTTGGGACATTCG
chr19_jgvv140_8_t01 Vv19s0140g00120	Dioxygenase	17.6.1.13 hormone metabolism.gibbere lin.synthesis degradation.GA2 oxidase	ACGTGTTCTTCAAAGCCCT	TGGCAGGCTTCAATGAGGAG
chr2_jgvv25_272_t01 Vv02s0025g02960	Dioxygenase	17.5.1 hormone metabolism.ethylen e.synthesis degradation	CGCAACCAGAGCTGACCTAT	TTAAGACCTGCAACCCAGGC
chr3_jgvv91_89_t01 Vv03s0091g00310	Auxin responsive protein	17.2.3 hormone metabolism.auxin.i nduced regulated responsive activated	CCGAGAAGGATGCAAAAGCG	GACCGTTGACCCTTCCAGTT
chr6_jgvv80_106_t01 Vv06s0080g00090	Cytochrome P450	26.10 misc.cytochromeP4 50	CTTCTCGCCATCTTGGGT	GAGCTCCAGACTCGCCATTT
chr9_jgvv2_42_t01 Vv09s0002g00570	GDSL lipase	26.28 misc.GDSL motif lipase	TAGGCCTCTGGGTGTGTA	TTTGAATCTGGGTAGGCGGG

Table 2S Genes used as reference in RT-qPCR analyses

Gene identifier*	Fonction	Catégorie fonctionnelle	Sens (5'>3')	Anti-sens (3'>5')
V0 - 12X V1 - 12X		Mapman		
chr17_jgvw0_5_t01 Vv17s0000g10430	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4.9 glycolysis.glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase	GGCGTCGCCAGATCGTGAT	AGGCCGAGAAGGGTGACCGG
chr5_jgvv20_398_t01 Vv05s0020g04250	Mitosis protein dim1	35.1 not assigned.no ontology	ACCTTCACTCTGGATGGGCCGT	CCCAATCGTGGCCGAACCGA
chr6_jgvv4_524_t01 Vv06s0004g02820	Sand protein	35.1 not assigned.no ontology	CGGGGTCGCAAACGGATCGT	GCCCCGTCCCCAGCATAGC

* *Vitis vinifera* sequencing has produced several versions : 8X, 12X V0, 12X V1

Partie I.3

Etude de l'interaction *Pythium oligandrum*, *Vitis vinifera* et *Phaeomoniella chlamydospora* par microscope confocale à balayage laser

1. Introduction

Les résultats des précédents travaux (partie I.1 et I.2, pages 91 et 108, respectivement) ont montré que, 14 jours après l'inoculation par l'agent pathogène, les réponses transcriptomiques au niveau du bois des plants de vigne sont différentes selon les modalités. Certains gènes impliqués dans le système immunitaire du végétal, *e.g.* ceux associés à la synthèse des phénylpropanoïdes, des protéines PR, des hormones, des facteurs de transcription, étaient plus exprimés chez les plants pré-traités par *P. oligandrum* puis infectés par *P. chlamydospora*. L'objectif de cette partie a été de mettre en évidence, à côté des changements transcriptomiques, les modifications physiologiques qui ont eu lieu dans les tissus de la plante. Les analyses biochimiques de protéines, phytoalexines, composés phénoliques, produits *in planta* permettent d'établir un lien entre expression de gènes et la synthèse de ces molécules. Certaines études quantifient, par exemple, les stilbènes lors de l'induction du système de défenses du végétal (Dufour et al., 2013 ; Lambert et al., 2011 ; Marti et al., 2009). Dans la présente étude, une autre approche sera utilisée, la microscopie confocale à balayage laser (MCBL), car elle permet d'observer certaines réponses de la plante aux différents traitements, *e.g.* la formation de tyloses et de composés fluorescents comme les phénols. Ainsi, les stilbènes fluorescent à une longueur d'onde émettant dans le bleu (Bellow et al., 2012).

Le principe de la MCBL a été proposé en 1957 par Minsky, puis utilisé expérimentalement à partir de 1980 suite au développement de sources laser adaptées et aux progrès en instrumentation électronique et informatique. La microscopie confocale vise à améliorer la microscopie de fluorescence conventionnelle dont un des inconvénients majeurs est une perte de résolution due à l'émission de fluorescence délocalisée qui se superpose à l'image du plan focal. La microscopie confocale permet de pallier à ce problème en utilisant un diaphragme (pinhole confocal) qui ne laisse passer que le rayonnement issu du plan focal. En observant ainsi des plans successifs, il est possible de reconstituer l'image en 3 dimensions (3D) de l'objet (Héliot, 2006). Le processus de la MCBL est le suivant : le rayon laser exciteur pénètre dans l'échantillon marqué par des fluorochromes ou de matériel fluorescent ce qui induit l'émission des rayons fluorescents provenant de différents plans de préparation. Grâce à un diaphragme variable ou « pinhole » qui élimine le signal fluorescent provenant d'autres plans, il est possible de sélectionner les rayons émis par un seul plan de la préparation. Ces rayons passent alors à travers un bloc de filtrage des longueurs d'onde, puis arrivent à un système de détection par photomultiplicateurs. Le microscope confocal est piloté

par un logiciel informatique, qui permet de régler les paramètres de l'acquisition et d'enregistrer les données acquises. Le traitement et la visualisation de l'échantillon en 3D se fait via l'utilisation de plusieurs logiciels de traitement d'image.

2. Matériel et méthodes

2.1. Dispositif expérimental

Des boutures de Cabernet Sauvignon à deux yeux âgées de 8 semaines ont été utilisées sous serre en conditions contrôlées. Ces dernières ont été détaillées dans la partie I.1 (page 94). L'essai a été conduit en randomisation totale avec 30 répétitions par traitement. Quatre modalités ont été effectuées, correspondant à des plants (i) percés au niveau de la tige, (ii) attaqués avec le champignon, *P. chlamydospora*, (iii) inoculés, au niveau racinaire par *P. oligandrum* et percés au niveau de la tige, (iv), inoculés par *P. oligandrum* au niveau des racines et tiges infectées par *P. chlamydospora*.

Au stade 7-8 feuilles, les boutures ont été inoculées avec 100 mL d'une solution à 10^4 oospores/mL de *P. oligandrum* souche Po37 (préparation par Biovitis) au niveau des racines. Une semaine après l'inoculation par l'oomycète, l'infection avec *P. chlamydospora* souche SO37 (souchothèque UMR SAVE) a été réalisée au niveau des tiges. L'agent pathogène a été déposé sous forme de disque de mycélium dans la bouture préalablement percée à 4 mm de profondeur sous le premier bourgeon. Afin d'empêcher la pénétration d'autres champignons, le trou a été refermé avec de la paraffine. Six plants par modalité ont été prélevés 14 jours après l'inoculation par *P. chlamydospora*. Une partie des tiges, 2 cm au-dessus et 2 cm en dessous du point de perçage, de 9 plants par modalité ont été prélevées et sectionnées longitudinalement. Les morceaux de bois prélevés, ont été coupés longitudinalement en 2 parties, puis trempés directement dans une solution à 4% de paraformaldehyde (PFA) dans du PBS (Phosphate Buffered Saline) : contenant 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ et 1,76 mM KH₂PO₄. Pour chaque échantillon, un volume de 10 ml de cette solution a été rajouté jusqu'à immersion totale des morceaux de bois dans la solution. Les échantillons ont été placés à 4°C pendant 15 heures pour la fixation puis, 3 lavages successifs avec la solution saline (PBS) ont été effectués. Les échantillons ont été conservés dans la 3^{ème} solution de lavage puis placés à 4°C jusqu'à utilisation.

2.2. Observation au microscope par microscope confocal à balayage laser

Pour chaque échantillon, une pièce de bois de 1 cm de longueur a été coupée transversalement, à l'aide d'un sécateur au niveau du point d'inoculation contenant ou non le pathogène. Les observations ont été réalisées avec un microscope confocal (Olympus Fluview FV1000 avec un laser multi-ligne FV5-LAMAR-2 et un laser HeNe(G) laser FV10-LAHEG230-2). Des objectifs ayant un grandissement de 10×, 20× et 40× ont été utilisés. Des images 3D selon les axes X, Y, Z contenant 20 à 60 scans ont été prises séparément pour chaque longueur d'onde 405, 488 et 549 nm, elles correspondant respectivement aux émissions dans le bleu, vert et orange-rouge. Les paramètres du microscope restent inchangés. Le logiciel Image J a été software 147v a été utilisé pour le traitement des images et les images ont été reconstruites.

3. Résultats

Pour chaque échantillon, une coupe transversale au niveau du point d'infection de la tige contenant ou non l'agent pathogène a été effectuée. Les inoculations des microorganismes *P. oligandrum* et/ou *P. chlamydospora* ainsi que le perçage de la tige ont révélé des zones de réactions fluorescentes, 14 jours après l'infection par l'agent pathogène. Les cellules du parenchyme entourant les vaisseaux du xylème émettent une fluorescence dans les différentes longueurs d'onde (405, 488 et 549 nm). Les vaisseaux de xylème des plants ont présentés des tyloses, en réponse aux stress abiotique (perçage) ou biotique (agent pathogène) exercé sur la plante (Figure1).

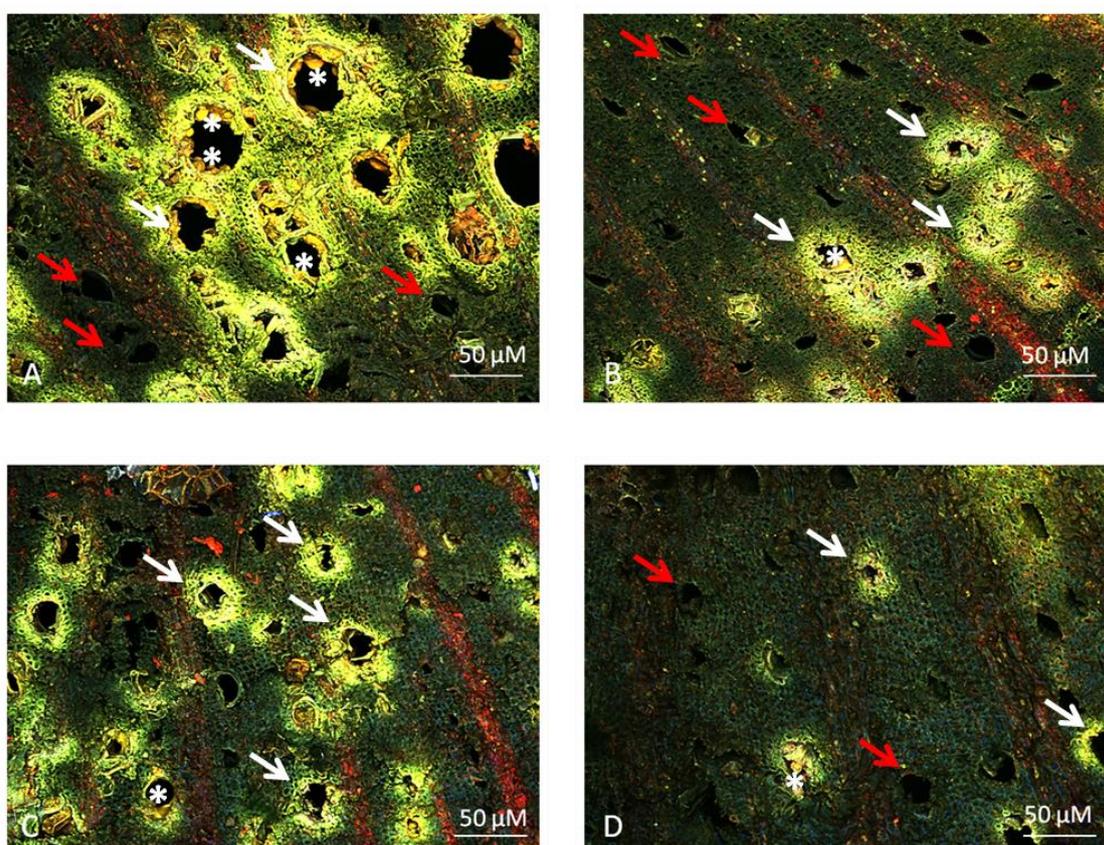


Figure 1 : Coupes transversales au niveau des vaisseaux de xylème adjacents de plants percés et colonisés ou non par *P. oligandrum* et/ou *P. chlamydospora*. (*) Vaisseaux de xylème présentant des tyloses. (→) Vaisseaux de xylème entourés par des cellules qui n'émettent pas de fluorescence. (↗) Vaisseaux de xylème entourés par des cellules fluorescentes. A : témoin percé, B : plant avec racines colonisées par *P. oligandrum* et percé au niveau de la tige, C : plant infecté par *P. chlamydospora* et D : plants traités par *P. oligandrum* et infectés par *P. chlamydospora*.

Les zones proches du point d'inoculation ont été observées. Les premiers résultats, ont montré qu'en présence de *P. oligandrum*, les réactions de défense de la plante sont moins intenses, il y a moins de tyloses et de vaisseaux de xylèmes fluorescents que chez les plants (i) percés (Figure 1A), (ii) infectés par *P. chlamydospora* (Figure 1C), (iii) inoculés par *P. oligandrum* au niveau racinaire et percés au niveau de la tige (Figure 1B), et (iv) inoculés par les deux microorganismes (Figure 1D).

Afin de généraliser cette observation sur toute la section, le nombre de vaisseaux du xylème présentant des tyloses ou des composés fluorescents en rapport aux nombres de vaisseaux du xylème a été calculé, pour les 3 longueurs d'onde. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 2.

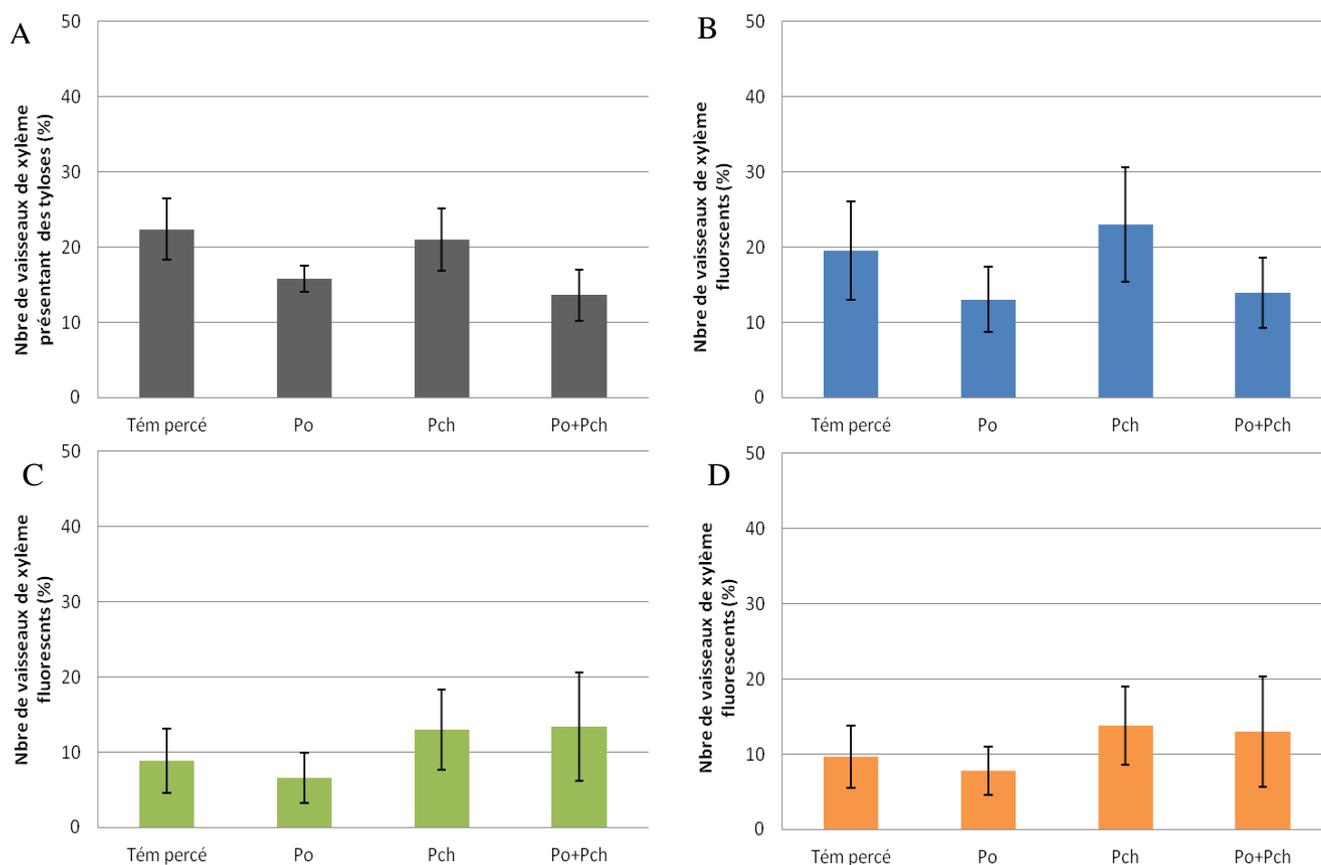


Figure 2 : Pourcentage (\pm erreur standard) de vaisseaux de xylème fluorescents par rapport au nombre total de vaisseaux du xylème.

A : vaisseaux avec tyloses fluorescents à une longueur d'onde de 405 nm; B : vaisseaux fluorescent en bleu avec longueur d'onde bleue, 405nm ; C : verte, 488 nm et D : rouge-orangé 549 nm.

Tém percé : témoin percé ; Po : plants dont les racines sont colonisées par *P. oligandrum* et percés au niveau de la tige ; Pch : plant infecté par *P. chlamydozpora* ; Po+Pch : plants traités par *P. oligandrum* et infectés par *P. chlmaydozpora*.

Pas de différences statistiquement significatives entre les modalités.

Pour toutes les conditions, le plus faible nombre de tyloses et de composés phénoliques émettant des fluorescences bleues, vertes et rouge-oranges est obtenu avec les plants uniquement colonisés par *P. oligandrum* (Figure 2). Dans la condition *P. oligandrum* + *P. chlamydozpora*, le nombre de tyloses et de composés phénoliques émettant des fluorescences bleues est aussi moins important que lorsque les plants sont inoculés uniquement avec *P. chlamydozpora*. Cette observation n'est par contre pas vérifiée pour les émissions aux 2 autres longueurs d'ondes (vertes et rouge-oranges), les valeurs sont quasiment identiques pour les 2 conditions (Figure 2 C et D). Les différences entre les modalités ne sont cependant pas statistiquement significatives.

4. Discussion

A l'instar de ce qui avait été montré pour les analyses transcriptomiques décrites aux deux premières parties de ce chapitre (partie I.1 page 92 et partie I.2 page 108), les observations en microscopie confocale ont confirmé que la méthode d'inoculation du pathogène qui commence par un perçage de la tige, induit un stress abiotique important pour la plante. Dans le cas présent, cela s'est matérialisé par la formation de tyloses et de composés fluorescents, certains étant vraisemblablement d'origines phénoliques. Ce résultat est cohérent avec d'autres études qui ont montré que cette méthode d'inoculation induit des changements au niveau transcriptomique (Yacoub et al., 2016) et au niveau des tissus du plant de vigne (Pierron et al., 2015).

Dans notre étude, les plus faibles réponses ont été observées chez les plants colonisés uniquement par *P. oligandrum*, ce qui est en adéquation avec de précédents travaux utilisant ce micro-organisme sur d'autres plantes (Le Floch et al., 2003a ; 2009 ; Picard et al., 2000). Pour les boutures de la modalité, *P. oligandrum* + *P. chlamydospora*, il y aurait une tendance pour 2 réponses, *i.e.* formation de tyloses et émission de composés fluorescents dans le bleu, à être moins exprimées que chez les plants infectés uniquement avec le pathogène. Cependant, si une tendance est mise en évidence, les différences observées entre ces deux modalités ne sont pas statistiquement significatives. Concernant l'émission de tyloses, en absence d'hyphes de *P. chlamydospora* dans les vaisseaux, ce qui est le cas ici, cette réaction de défense pourrait avoir un effet négatif sur la physiologie de la plante en entravant le flux xylémique. Le nombre réduit de tyloses dans la condition *P. oligandrum* + *P. chlamydospora* n'est donc, a priori, pas négatif pour les boutures.

Le fait que les observations aient été réalisées assez rapidement, 14 jours après l'inoculation de l'agent pathogène, pourrait expliquer les faibles différences observées en microscopie entre les traitements. *P. chlamydospora* est en effet un champignon qui se développe lentement dans le bois. Selon, Pierron (2013) ce pathogène colonise les vaisseaux de xylème 12 semaines après inoculation et certaines réactions de défenses de la plante, *i.e.* renforcement de la paroi cellulaire et formation des tyloses, étaient alors aisément observées. Martin et al. (2009) ont montré que l'infection de plants de vigne par *P. chlamydospora* induisait l'augmentation de production de certains produits phénoliques (trans-resveratrol et e-viniferine), 5 mois après l'infection par cet agent pathogène. On peut néanmoins penser que

cette émission avait déjà commencé, à des concentrations plus faibles, bien avant cette augmentation.

En somme, si les analyses transcriptomiques sont suffisamment sensibles pour étudier les réponses de la plante 14 jours après l'infection par *P. chlamydospora*. Pour les observations microscopiques, un échantillonnage plus tardif des plants permettrait certainement d'optimiser cette expérimentation et de mettre en évidence des différences entre les modalités.

Chapitre II

Interaction *Pythium oligandrum*,
Phaeomoniella chlamydospora et vigne :
impact sur la microflore indigène et étude de
l'induction de résistance chez des plants
greffés

Introduction

Lors des travaux accomplis au chapitre 1, l'aptitude de *Pythium oligandrum* à coloniser les racines de boutures de Cabernet Sauvignon et induire une résistance contre un agent impliqué dans l'esca, *P. chlamydospora*, a été étudiée. Ces plants étaient « pied-franc » mais depuis les ravages du phylloxera en Europe à la fin du XIXème siècle, la plupart des vignobles utilisant des cépages traditionnels européens sont greffés sur des porte-greffes américains résistants aux attaques de cet insecte (Forneck et al., 2002). Il en résulte que la partie racinaire des ceps des pépinières et des vignobles provient des porte-greffes. Etant donné que *P. oligandrum* est un colonisateur naturel de la rhizosphère des ceps (Gerbore et al., 2014), la capacité d'implantation de cet oomycète au niveau des porte-greffes doit être vérifiée, certains d'entre eux pourraient en effet être plus aisément ou difficilement colonisés par *P. oligandrum*.

Lors de la première partie de ce chapitre, l'implantation de cet oomycète au niveau des systèmes racinaires de différents cépages, porte-greffes et des différentes combinaisons porte-greffes/cépages a été évaluée. L'effet direct sur la microflore de la rhizosphère, ou indirect sur celle de phyllosphère, sera également étudié. La seconde partie de ce chapitre consistera à déterminer la capacité de *P. oligandrum* à protéger les plants greffés, contre une attaque par *Phaeoconiella chlamydospora*.

Partie II.1

Colonisation racinaire de plants de vigne par
Pythium oligandrum et influence sur les
communautés microbiennes colonisant la
vigne

1. Introduction

L'implantation de *P. oligandrum* sur les racines de 2 cépages « pieds-francs », de 3 porte-greffes et des différentes combinaisons possibles entre eux sera évaluée. Les deux cépages qui serviront de greffons sont le Cabernet Sauvignon et le Sauvignon Blanc. Le premier est le cultivar le plus planté dans le monde (6% du vignoble mondial) et le second est le 8^{ème} (2%). Le Cabernet Sauvignon est un cépage noir très connu en France grâce aux grands crus de bordeaux, il est également répandu en Europe et dans les vignobles du monde entier (Afrique du Sud, Californie, Chili). Il a été utilisé dans la première partie de nos travaux et il présente une sensibilité moyenne à l'esca selon l'échelle des sensibilités de Grosman et Doublet (2012). Le Sauvignon Blanc est un cépage blanc relativement sensible à l'esca, qui lui aussi est répandu en France et dans de nombreux pays viticoles. Pour ce qui concerne les porte-greffes, nous avons sélectionné le SO4, un porte-greffe historique, qui est le 1^{er} en terme de surface en France (200 000ha ; 22,3% en 2010), le 3309C qui est le 3^{ème} (160 000 ha ; 14,1%) et le 101-14 qui est 7^{ème} (40 000 ha ; 5,8%).

Afin de quantifier *P. oligandrum* au niveau racinaire, deux approches différentes ont été utilisées: une de microbiologie pasteurienne et une de PCR quantitative en temps réel. Le principe général de cette dernière est décrit ci-dessous :

Description de la PCR quantitative utilisant la technologie TaqmanTM

La PCR quantitative (PCRq) est une méthode moléculaire permettant de mesurer le nombre d'amplicons synthétisés à partir d'un couple d'amorces spécifiques. Le suivi de la quantité d'ADN présente dans la réaction à un moment donné est possible grâce à cette technique. La PCRq repose sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent qui se fixe sur l'ADN, et permet de suivre de façon proportionnelle l'évolution des amplifications. Il existe deux systèmes de détection et de quantification du signal fluorescent en temps réel :

- les agents intercalants, molécules capables de s'insérer entre les bases appariées d'un acide nucléique. Actuellement, l'agent intercalant le plus utilisé est le Sybr® Green.
- les sondes fluorescentes qui se composent de quatre technologies principales de sensibilité égale: Taqman ou hydrolyse de sondes, HybProbes (FRET), Molecular Beacons et Scorpion.

La sonde Taqman™, utilisée pour quantifier *P. oligandrum* au niveau des racines de jeunes plants de vigne, est constituée d'un fragment oligonucléotique, de 25 à 30 nucléotides marqué par deux groupements fluorophores aux extrémités 5' et 3'. Les principales étapes de cette technique sont présentées sur la figure ci dessous.

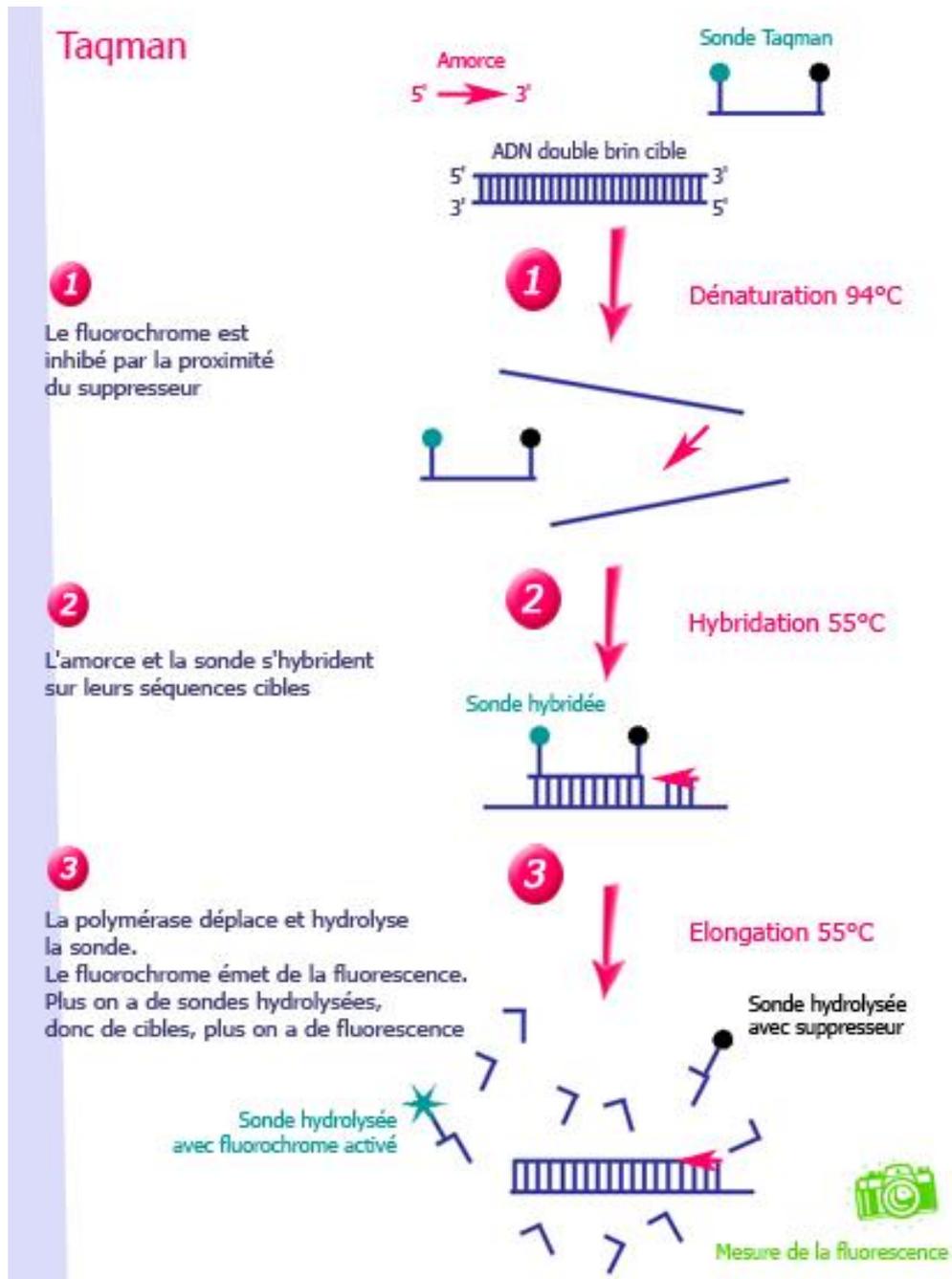


Figure 1 : Principe d'une PCR quantitative avec l'utilisation de la sonde Taqman® (Poitras et al., 2002)

Suite à la mesure par PCRq, des analyses par empreinte moléculaire, Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP), ont été réalisées dans le but d'étudier l'impact de l'inoculation de *P. oligandrum* sur la microflore fongique et bactérienne indigène. La technique utilisée est décrite ci-après:

Description de la technique de SSCP

La SSCP a été initialement développée pour la détection du polymorphisme ou de mutations ponctuelles de l'ADN puis elle a été adaptée à l'étude des communautés microbiennes. Cette technique est basée sur la séparation d'ADN simples brins ayant adopté une conformation tridimensionnelle particulière en conditions non dénaturantes, ce repliement étant dépendant de la séquence nucléotidique et de l'environnement physico-chimique (température et force ionique). Les différentes conformations vont générer des comportements migratoires et des mobilités différentes, rendant possible la séparation de mélanges complexes de populations. La structure secondaire permettra de distinguer des produits appartenant à des phylotypes différents même s'ils possèdent le même poids moléculaire. Elle permet également de séparer des produits PCR ayant une longueur similaire mais ayant des séquences nucléotidiques différentes. L'avantage principal de cette technique est qu'elle permet d'analyser un grand nombre d'échantillons dans un court laps de temps, permettant ainsi d'évaluer la diversité et de comparer les changements structurels au sein des communautés étudiées. La SSCP présente cependant certains inconvénients : certains ADN simples brins peuvent adopter plusieurs conformations, il en résulte que plusieurs pics peuvent représenter un même ribotype ; à l'inverse, un pic peut être présent chez plusieurs ribotypes différents (Hong et al., 2007 ; Zinger et al., 2007). Malgré ces limites, la SSCP a été utilisée avec succès en écologie microbienne, par exemple pour étudier la dynamique des communautés fongiques et bactériennes en culture hors-sol (Vallance et al., 2009, 2012) ainsi que la microflore endophyte colonisant le bois de ceps de vigne atteints d'esca (Bruez et al., 2014, 2015). Les principales étapes de cette technique sont présentées sur la figure ci dessous :

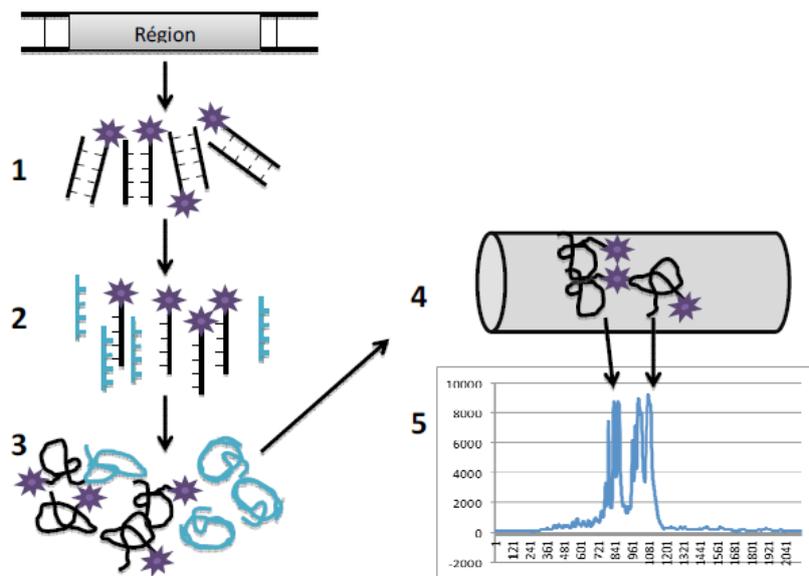


Figure 2 : Les principales étapes de la technique SSCP. (1) Amplicons de la PCR ayant été générés en utilisant un couple d'amorces dont une était marquée. (2) Dénaturation des amplicons 5 min à 95°C. (3) Chaque brin dénaturé est refroidi à 0°C, cette conformation est maintenue par la présence de formamide. (4) Les brins migrent dans le séquenceur en électrophorèse capillaire à des vitesses variables selon leur taille et leur poids. (5) Pour chaque échantillon, un chromatogramme est obtenu. Les échantillons sont ensuite alignés ensemble à l'aide d'un étalon interne préalablement inclu dans chaque échantillon.

2. Matériel et méthodes

2.1. Dispositif expérimental

L'expérimentation a été mise en place dans une serre de la Chambre d'Agriculture de Gironde à Blanquefort (33) en avril 2014. Le dispositif comporte 3 porte-greffes, *i.e.* SO4, 3309C et 101-14 Mgt, 2 cépages, *i.e.* Sauvignon Blanc et Cabernet Sauvignon, et les différentes combinaisons porte-greffe/cépage correspondantes, soit un total de 11 associations végétales. Chaque combinaison comprend 2 modalités : des plants inoculés par *P. oligandrum* au niveau racinaire et d'autres témoins non inoculés par l'oomycète. Chaque modalité comporte 10 plants, soit un total de 220 plants de vigne pour le dispositif complet (tableau 1).

Tableau 1 : Récapitulatif des différentes modalités.

Témoin : plants non inoculés par *P. oligandrum*, Po : Plants inoculés par *P. oligandrum*, CS : Cabernet Sauvignon et SB : Sauvignon Blanc

	Plants témoin	Plants Po	Total
SO4	10	10	20
3309	10	10	20
101-14	10	10	20
CS	10	10	20
CS + SO4	10	10	20
CS + 3309	10	10	20
CS + 101-14	10	10	20
SB	10	10	20
SB + SO4	10	10	20
SB + 3309	10	10	20
SB + 101-14	10	10	20
Total	110	110	220

2.2. Inoculation des jeunes plants de vigne par *P. oligandrum*

Les plants ont été inoculés avec une suspension d'oospores de *P. oligandrum* (souche Po37, collection UMR SAVE, INRA Bordeaux), au stade 4-5 feuilles étalées. L'inoculum a été préparé par fermentation en milieu liquide par la société Biovitis SA (Saint Etienne de Chomeil, France). L'inoculation a été réalisée en juin 2014 au niveau des racines par percolation de 50 mL de milieu à 10^5 oospores/mL.

2.3. Prélèvement du matériel végétal

Les prélèvements de feuilles ont été effectués 1 mois, et les prélèvements racinaires 1, 3 et 18 mois après l'inoculation par *P. oligandrum*. Neuf échantillons foliaires et 9 échantillons racinaires ont été prélevés pour chaque modalité avant d'être regroupés, de manière aléatoire, en 3 répétitions par modalité. Les prélèvements ont été conditionnés dans des feuilles de papier d'aluminium stockés à -20°C pour les feuilles. Pour les racines, une partie des échantillons a été utilisée pour les analyses microbiologiques et l'autre partie a été stockée à -20°C pour les analyses moléculaires.

2.4. Evaluation de l'implantation de *P. oligandrum* au niveau des racines par méthode cultivable

Cette technique a été décrite dans le chapitre précédent (partie I.1, page 94)

2.5. Evaluation de l'implantation de *P. oligandrum* au niveau des racines par méthode PCRq

Extraction de l'ADN total à partir de racines de vigne

Les extractions d'ADN ont été réalisées à l'aide d'un kit commercial, l'Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitek). Les échantillons prélevés à partir de feuilles et de racines de vigne ont été broyés dans de l'azote liquide à l'aide d'un broyeur à bille TissueLyserII (Qiagen).

Environ 60 mg de biomasse ont été placés dans un tube Eppendorf contenant 400 μL de tampon de lyse P additionné de 20 μL de protéinase K. Les solutions de lyse ont été incubées 45 minutes (min) à 65°C avant d'être transférées sur des colonnes filtrantes puis centrifugées 1 min à 12000 rpm. Après élimination des colonnes filtrantes, 40 μL de RNaseA à 10 ng/ml ont été ajoutés au filtrat. Les tubes ont été vortexés brièvement et incubés 5 min à

température ambiante. Deux cents μL de tampon de fixation P ont ensuite été ajoutés au filtrat et vortexés avant d'être transférés sur une nouvelle colonne filtrante. Après incubation 1 min à température ambiante, les tubes ont été centrifugés 1 min à 12000 rpm. Les membranes filtrantes sur lesquelles sont fixés les ADN ont ensuite été transférées dans un nouveau tube collecteur avant de subir 2 étapes de lavage. Cinq cents cinquante μL de tampon de lavage I ont été ajoutés avant d'être centrifugés 1 min à 12000 rpm. Le filtrat a été éliminé et 550 μL de tampon de lavage II ont été ajoutés puis centrifugés 1 min à 12000 rpm. Cette étape de lavage avec le tampon II a été répétée 2 fois. Afin d'éliminer les traces d'éthanol contenues dans le tampon de lavage II, les membranes ont été centrifugées 3 min à 12000 rpm afin de les sécher. Les membranes ont ensuite été transférées dans un nouveau tube collecteur et 50 μL de tampon d'éluion D préalablement chauffé à 65°C ont été déposés en leur centre. Après une incubation de 3 min à température ambiante et une centrifugation d'une min à 10000 rpm, les ADN ont été élués puis dosés au nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer, ThermoScientific, Labtech) avant d'être stockés à -20°C avant utilisation.

*Extraction de l'ADN de *P. oligandrum**

Le mycélium de cultures de *P. oligandrum* âgées d'une semaine est prélevé stérilement à l'aide d'un scalpel et placé dans un tube eppendorf de 1,5mL. La matière fraîche est déshydratée par lyophilisation pendant une nuit. Le mycélium déshydraté est vortexé avec 1ml de tampon d'extraction (100mM de Tris-HCl; 20mM EDTA ; 1,4M NaCl ; 2% CTAB; 2% PVPP ; 0,5% v/v β -mercapto-ethanol) et 4 μL de RNase A. Après incubation à 65°C pendant 1h, les tubes sont centrifugés 30 sec à 2000 rpm. Cinq cents μL de chloroforme isoamyl alcohol 24:1 sont ajoutés au mélange et homogénéisés par renversement des tubes puis incubés 5 min dans la glace. Une étape de centrifugation à 4°C pendant 10 minutes à 14000 rpm permet de différencier la phase aqueuse contenant l'ADN. Quatre cents μL de surnageant sont prélevés et mélangés à 330 μL d'isopropanol froid par renversement manuel des tubes. L'ADN est mis à précipiter à -20°C pendant 2h puis centrifugé à 4°C pendant 10 min à 14000 rpm. Après élimination du surnageant, le culot est rincé avec 800 μL d'éthanol 70° . Après 5 min d'incubation dans la glace, une nouvelle centrifugation à 4°C pendant 10 min à 14000 rpm est réalisée. Le surnageant est éliminé puis le culot d'ADN est mis à sécher au Speed Vac pendant 15 min. Le culot d'ADN est finalement repris dans 50 μL d'eau « nuclease free ». Les échantillons d'ADN obtenus sont stockés à -20°C .

Quantification de P. oligandrum par PCRq

La colonisation racinaire de *P. oligandrum* a été quantifiée par PCR en utilisant les amorces spécifiques eucaryotes UpF1, Lo146 et la sonde Taqman™ (FAM 142 LNA) (tableau 2). Avant de réaliser les amplifications de PCR quantitative (PCRq), un mélange réactionnel de 25 µL est effectué. Ce mélange contient 12,5 µl de Quantitect Mix (Mix de chez Quiagen), 0,5 µL de chaque amorce (UpF1, Lo146 et 142 LNA à 20 µM), 10 µL d'eau RNase Free et 2 µL d'ADN déjà extraits. Les amplifications sont faites à l'aide d'un thermocycleur Stratagene (Agilent Technologies Stratagene Mx3005pro) dont le programme est le suivant: dénaturation initiale de 15 minutes à 95°C suivie de 40 cycles comprenant une phase de dénaturation (30 secondes à 94°C), une phase d'appariement des amorces (30 secondes à 60°C) et une phase d'élongation (30 secondes à 72°C). La fluorescence a été mesurée à chaque cycle après l'étape d'élongation. Deux contrôles sans ADN sont inclus comme contrôle négatif pour chaque paire d'amorces, ainsi qu'une gamme de dilution d'échantillons purs de la souche de *P. oligandrum* utilisée pour quantifier l'agent de biocontrôle. La gamme standard est composée de 8 dilutions allant de 36,7 ng/µL à 3,67.10⁻⁶ ng/µL.

Les résultats ont ensuite été analysés à l'aide du logiciel MxPro pour réaliser la courbe étalon nécessaire au calcul de la quantité d'ADN de *P. oligandrum* détectée dans l'échantillon. La courbe étalon permet également de vérifier l'efficacité (R²) de la gamme et de valider l'analyse PCRq.

Tableau 2 : Amorces et sonde fluorescente utilisées pour la PCR quantitative (a Godfrey et al., 2003, b Le Floch et al., 2007, c Tambong et al., 2006)

Gène cible	Nom	Séquence	Taille de l'amplicon
<i>P. oligandrum</i>	up F1 ^a	5'-TGCTTCGTCGCAAGACT-3'	
ITS	Lo 146 ^b	5'-CGTATTCGGAGTATAGTTCAGT-3'	124 pb
	142 LNA ^c	5'-FAM-AGTCTGCGTCTATTTTGGGA-BHQ1-3'	

2.6. Effet de *P. oligandrum* sur les communautés microbiennes colonisant la vigne

Amplification de l'ADN microbien par PCR

Les ADN ont été extraits à partir des racines mais aussi des feuilles en utilisant le même protocole d'extraction que celui décrit dans le paragraphe 2.5 (page 167). Les différents jeux d'amorces utilisés pour étudier les populations bactériennes et fongiques sont présentés dans le tableau 3. Les réactions d'amplification par PCR ont été effectuées dans un thermocycleur Mastercycler Gradient (Eppendorf) dans un volume réactionnel de 25 μL contenant 1 μL d'ADN (10 ng/ μL), 2,5 μL de tampon Pfu (10x), 1 μL de dNTP (10 mM), 0,5 μL de chaque amorce à 20 μM (Tableau x), 2,5 μL de BSA à 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (BioLabs), 0,5 μL de Pfu turbo (Agilent Technologies) et 16,5 μL d'eau distillée stérile. Les amplifications ont été réalisées à l'aide de la Pfu Turbo, cette Taq polymérase génère des fragments d'ADN à bouts francs et possède un taux d'erreurs faible ($1,6 \times 10^{-6}$ erreurs/base). De la Serum Albumine Bovine (BSA) a été incorporée aux mélanges réactionnels afin de supprimer l'action d'inhibiteurs de PCR comme les polysaccharides et les composés phénoliques extraits de la plante en même temps que les ADN. Le programme suivant a été utilisé pour les ADNs fongiques: dénaturation initiale de 2 min à 94°C suivie de 35 cycles de dénaturation (30 secondes (sec) à 94 °C), de fixation des amorces (30 sec, 58°C), d'élongation (1 min à 72°C) et d'une élongation finale de 10 min à 72°C. Pour les bactéries, le programme a consisté en une dénaturation initiale de 2 min à 94°C suivie de 25 cycles de dénaturation (45 sec à 94 °C), de fixation des amorces (30 sec, 54°C), d'élongation (1 min à 72°C) et d'une élongation finale de 10 min à 72°C.

Tableau 3 : Amorces utilisées pour amplifier l'ADN fongique et bactérien. *: Amorces marquées en 6-FAM (6-carboxyfluorescéine). ⁽¹⁾ White et al. (1990), ⁽²⁾ Redford et al. (2010)

	Gène	Nom amorces	Séquence 5'3'	Taille amplicon	T°C annealing
Champignons	mt LSU ADNr	ML1* ⁽¹⁾	6-FAM GTACTTTTGCATAATGGGTCAGC	253 bp	58°C
		ML2* ⁽¹⁾	6-FAM TATGTTTCGTAGAAAACCAGC		
Bactéries	16S ADNr	799f ⁽²⁾	AACMGGATTAGATACCCKG	≈ 350 bp	50°C
		1115r* ⁽²⁾	6-FAM AGGGTTGCGCTCGTTG		

Analyse SSCP

Après vérification sur gel d'agarose, les produits d'amplification ont été préparés pour l'analyse SSCP: 1 μL de produit PCR a été mélangé à 18,8 μL de formamide déionisé (Applied Biosystem) et 0,2 μL d'étalon interne (marqueur de taille GeneScan-400 ROX, Applied Biosystem). Un chauffage à 95°C pendant 5 min a été réalisé pour permettre la dénaturation des brins puis les échantillons ont été plongés dans la glace pendant 10 min afin d'éviter leur réappariement. Les brins d'ADN ainsi obtenus ont alors été séparés par électrophorèse capillaire et détectés grâce au marquage des amorces (6-FAM). L'électrophorèse a été réalisée avec un séquenceur automatique ABI PRISM 3130 (Genetic Analyzer 3130, Applied Biosystem) équipé de 4 capillaires de 36 cm, remplis de polymère composé de 5,6% de POP Conformational Analysis Polymer (Applied Biosystem), 10% de glycérol, de tampon EDTA (10x) et d'eau. Les conditions suivantes de migration ont été appliquées : 15kV et 32°C pendant 2000 secondes. Les profils SSCP obtenus ont ensuite été alignés avec StatFingerprints puis analysés en Analyse en Composantes Principales à l'aide du logiciel R (2.15.1).

3. Résultats

3.1. Evaluation de l'implantation de *P. oligandrum* au niveau des racines par méthode cultivable

La colonisation de la rhizosphère par *P. oligandrum* a été évaluée par dépôt de fragments racinaires sur milieu CMA-PARP. Les résultats sont illustrés dans le tableau 4. Quel que soit le temps de prélèvement, aucun fragment racinaire des plants témoins (non inoculés) n'était positif à la colonisation par l'oomycète.

Tableau 4: Colonisation racinaire de *P. oligandrum* évaluée par méthode culturale selon l'association ou non porte-greffe/cépage.

Les séries sont regroupés selon le type de cépage (Cabernet Sauvignon et Sauvignon Blanc) et le type de porte-greffe (101-14, 3309, SO4). Les valeurs reportées sont les moyennes (en %) \pm erreur standard de 3 plants échantillonnés. La modalité Cabernet Sauvignon non greffé est manquante. T+1 Mois = prélèvement de racines 1 mois post inoculation, T+3 Mois = prélèvement de racines 3 mois post inoculation. Les moyennes avec les même lettres ne sont pas significativement différentes à $p < 0,05$ selon le test de Kruskal-Wallis. Les tests statistiques ont été effectués séparément pour chaque temps de prélèvement. PG : Porte-Greffe. ND : Non Disponible

		Pourcentage de colonisation par <i>P. oligandrum</i>								
		Aucun cépage			Cabernet Sauvignon			Sauvignon Blanc		
T+1 Mois	101-14	60	\pm	20,81 b	0	\pm	0 c	3,33	\pm	3,33 c
	3309	100	\pm	0 a	0	\pm	0 c	79,63	\pm	15,15 ab
	SO4	0	\pm	0 c	29,52	\pm	24,69 bc	54	\pm	23,23 bc
	Aucun PG	-	\pm	-	ND	\pm	ND	36,67	\pm	31,79 bc
T+3 Mois	101-14	86,67	\pm	6,69 a	33,33	\pm	33,33 a	0	\pm	0
	3309	20	\pm	20 a	92,96	\pm	3,61 a	33,33	\pm	33,33 a
	SO4	83,96	\pm	11,18 a	33,33	\pm	33,33 a	30	\pm	30 a
	Aucun PG	-	\pm	-	NA	\pm	NA	27,48	\pm	27,48 a

Le premier mois de l'expérimentation, *P. oligandrum* était significativement plus présent dans la modalité 3309 porte-greffe seul, 100% des fragments racinaires ayant été trouvés positifs. Par contre, l'oomycète n'a pas été détecté dans la rhizosphère du porte-greffe SO4 seul. Le porte-greffe 101-14 présente un niveau intermédiaire de colonisation (60%). Les résultats sont différents lorsque les porte-greffes comportent un greffon. Lorsque le cépage est le Sauvignon Blanc, la colonisation racinaire maximale a été obtenue en combinaison avec le porte-greffe 3309 (79,63%) suivi de SO4 (54%), une quantité très faible a été détectée avec 101-14 (3,33%). Les racines des plants greffés avec du Cabernet Sauvignon étaient faiblement colonisées le premier mois, sauf la combinaison avec le porte-greffe SO4 (29,52%).

Les résultats obtenus le troisième mois indiquaient qu'une évolution de la colonisation racinaire a eu lieu. Les porte-greffes seuls étaient très colonisés : le SO4 à 83,8% et 101-14 à 86,67% alors que 3309 l'était nettement moins (20%). Pour les plants greffés avec du Cabernet Sauvignon, les niveaux de colonisation des racines étaient très élevés pour 3309 (92,96%), alors que 101-14 et SO4 avaient le même taux de colonisation (33,33%). Concernant les plants greffés avec le cépage Sauvignon Blanc, pour toutes les combinaisons, les taux de colonisation ont baissé par rapport à ceux obtenus à T+1 Mois. Les quantités de *P. oligandrum* détectées sur les racines étaient relativement proches, pour les 3 conditions : 3309 (33,3%), SO4 (30%) et pied-franc (27,48%). L'oomycète n'a pas été détecté sur les racines des plants de Sauvignon Blanc greffé sur 101-14.

3.2. Evaluation par PCR quantitative de l'implantation de *P. oligandrum* au niveau des racines de plants de vigne

La colonisation des racines de jeunes plants de vigne par *P. oligandrum* a été quantifiée par PCRq. L'analyse a été réalisée sur les échantillons prélevés à T+1Mois et T+3Mois. Les résultats sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Colonisation racinaire de *P. oligandrum* évaluée par PCR quantitative selon l'association ou non porte-greffe/cépage.

Les variables sont exprimées en quantité moyenne d'ADN de *P. oligandrum*. Les séries sont regroupés selon le type de cépage (Cabernet Sauvignon et Sauvignon blanc) et le type de porte-greffe (101-14, 3309, SO4). Les valeurs reportées sont les moyennes (en %) \pm erreur standard de 3 plants échantillonnés. La modalité Cabernet Sauvignon non greffé est manquante. T+1M = prélèvement de racines 1 mois post inoculation, T+3M = prélèvement de racines 3 mois post inoculation. A date égale de prélèvement, il n'y a pas de différences significatives entre les modalités (Kruskall-Wallis à $p < 0,05$). PG : Porte-Greffe. ND : Non Disponible.

		Quantité de <i>P. oligandrum</i> (pg/ μ L)					
		Aucun cépage		Cabernet Sauvignon		Sauvignon blanc	
T+1 Mois	101-14	2,76 10^{-1} \pm	2,24 10^{-1} a	8,15 10^{-1} \pm	5,32 10^{-1} a	1,27 \pm	6,52 10^{-1} a
	3309	3,35 10^{-1} \pm	3,26 10^{-1} a	5,80 10^{-1} \pm	8,91 10^{-3} a	1,59 \pm	4,21 10^{-2} a
	SO4	6,87 10^{-2} \pm	1,97 10^{-2} a	8,91 10^{-3} \pm	9,81 10^{-1} a	1,06 10^{-1} \pm	3,83 10^{-2} a
	Aucun PG			ND	ND	1,65 10^{-1} \pm	0 a
T+3 Mois	101-14	0 \pm	0 a	5,09 10^{-3} \pm	2,97 10^{-3} a	5,85 10^{-3} \pm	3,27 10^{-3} a
	3309	2,44 10^{-3} \pm	2,44 10^{-3} a	0 \pm	0 a	1,71 10^{-3} \pm	1,71 10^{-3} a
	SO4	4,37 10^{-3} \pm	4,37 10^{-3} a	1,42 10^{-3} \pm	1,42 10^{-3} a	3,33 10^{-3} \pm	3,33 10^{-3} a
	Aucun PG			ND	ND	5,33 10^{-3} \pm	3,40 10^{-3} a

Quel que soit le temps de prélèvement, l'oomycète n'a pas été détecté dans les modalités témoins. Un mois après inoculation, *P. oligandrum* est détecté sur les trois porte-greffes (101-14, 3309 et SO4 seuls). Lorsque les porte-greffes comportent un greffon, les quantités de *P. oligandrum* retrouvées étaient supérieures, sauf pour la combinaison avec SO4, mais les valeurs ne sont pas significativement différentes (tableau 5). Les plants de Sauvignon Blanc greffés sur 101-14 et 3309 présentent des niveaux de colonisation légèrement plus élevés, avec des quantités moyennes respectivement de 1,27 pg/ μ L et 1,59 pg/ μ L d'ADN. Les racines des porte-greffes combinés avec le Cabernet Sauvignon ont des quantités d'ADN de *P. oligandrum* estimées à 8,15 10^{-1} pg/ μ L pour 101-14, à 5,8 10^{-1} pg/ μ L pour 3309 et 8,91 10^{-3} pg/ μ L pour SO4. Trois mois après le début de l'expérimentation, les quantités de *P. oligandrum* détectées sont beaucoup plus faibles que celles observées à T+1 Mois. Toutes les valeurs sont de l'ordre de 10^{-3} pg/ μ L. Malgré ces faibles valeurs, l'oomycète était présent au niveau de la rhizosphère de tous les plants, à l'exception des racines du porte-greffe 101-14 et des plants de Cabernet Sauvignon greffés sur 3309. A date de prélèvement égale, aucune différence significative n'a été observée entre les modalités.

3.3. Influence de *P. oligandrum* sur les communautés microbiennes indigènes colonisant la vigne

La structure des populations fongiques et bactériennes colonisant les plants de vigne, racines (effet direct) et feuilles (effet indirect), a été analysée par SSCP en utilisant des régions codant (i) pour l'ARN ribosomal 28S mitochondrial pour les champignons et (ii) l'ARN ribosomal 16S pour les bactéries. Le nombre de pics ainsi que le décollement de la ligne de base observés sur chacun des profils obtenus, témoignent de la diversité et de l'abondance des populations fongiques et bactériennes, sans toutefois en connaître la composition. L'analyse a été réalisée 1 mois après l'inoculation par *P. oligandrum*.

Analyse de l'effet organe sur la composition des populations microbiennes colonisant le plant de vigne

L'analyse comporte deux modalités tissulaires, des échantillons provenant de racines et d'autres de feuilles (Figure 3).

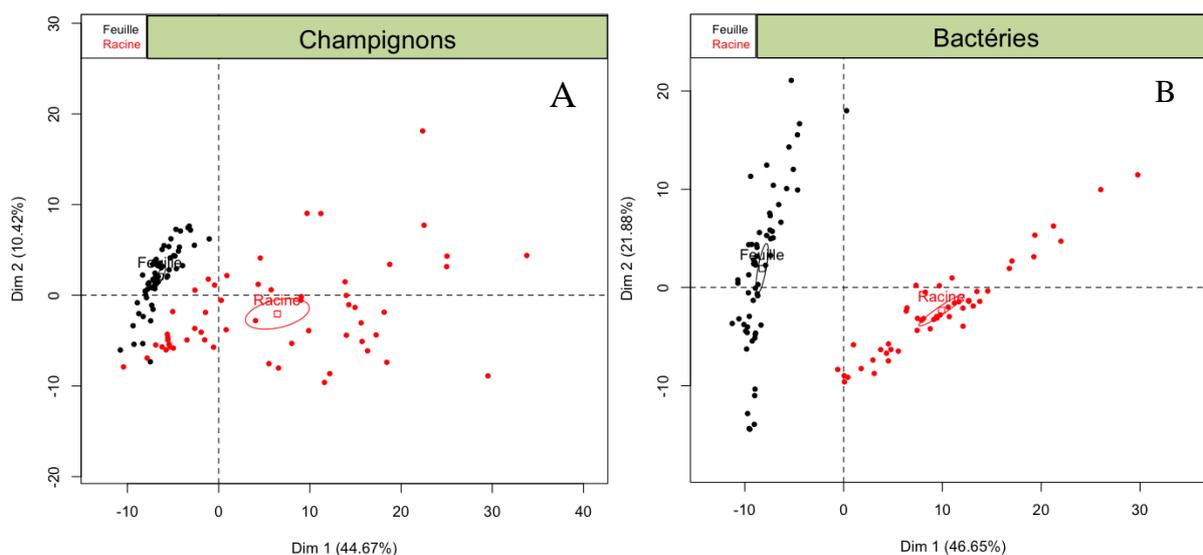


Figure 3: Analyses en Composantes Principales des communautés (ACP) fongiques (A) et bactériennes (B) colonisant les feuilles et les racines de vigne.

Le plan principal (axe 1 + axe 2) explique 55% et 68% de la variabilité totale des données, respectivement pour les champignons et les bactéries. Les ellipses correspondent à l'intervalle de confiance à 95

Le résultat des ACP a montré une différence significative dans la composition des populations microbiennes selon le tissu étudié : dans les deux cas, les ellipses ne se recouvrent pas. La dispersion des points sur le plan de l'ACP témoigne de la diversité des profils SSCP. En effet, plus les points sont éloignés et étalés sur celui-ci, plus les communautés étudiées sont diversifiées. Les populations fongiques étaient plus hétérogènes au niveau des racines qu'au niveau des feuilles (figure 3).

Analyse de l'effet porte-greffe sur la composition des populations microbiennes colonisant le plant de vigne

Pour mettre en évidence un éventuel effet du porte-greffe sur les communautés microbiennes colonisant les plants de vigne, les profils SSCP issus des modalités « porte-greffes et cépages Cabernet Sauvignon ou Sauvignon Blanc » ont été comparés pour les bactéries et les champignons (figure 4).

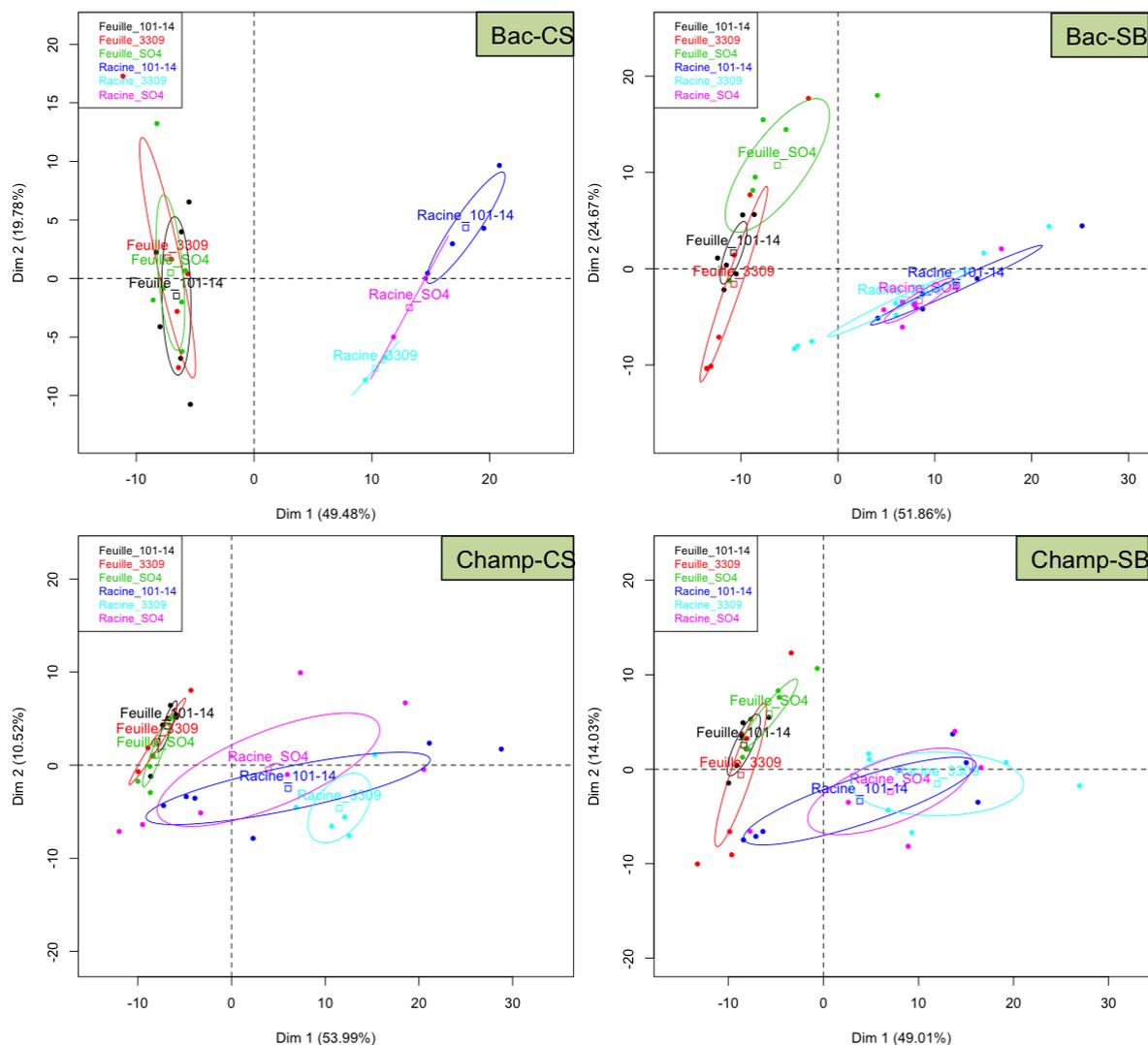


Figure 4 : Analyses en Composantes Principales des communautés fongiques et bactériennes colonisant les feuilles et les racines en fonction des cépages.

Bac : bactéries, Champ : champignons, CS : Cabernet Sauvignon; SB : Sauvignon Blanc; 101-14, 3309 et SO4 : porte-greffes. Les axes 1 et 2 expliquent 69%, 76%, 64% et 63% de la variabilité totale respectivement pour Bac-CS, Bac-SB, Champ-CS et Champ-SB. Les ellipses correspondent à l'intervalle de confiance à 95%.

Les résultats obtenus montrent que les porte-greffes utilisés influencent peu la structure génétique des communautés microbiennes pour un cépage donné. Les communautés bactériennes et fongiques se différencient surtout en fonction de l'organe qu'elles colonisent. Il n'y a aucune différence significative entre les flores fongiques et bactériennes des différents porte-greffes avec le Sauvignon Blanc. Sur le Cabernet Sauvignon, les flores fongiques racinaires des porte-greffes 3309 et SO4 semblent différentes entre elles, comme l'attestent leurs ellipses de confiance respectives qui se touchent sans se chevaucher. Pour ce qui est des flores bactériennes, un effet discriminant apparaît entre les porte-greffes 101-14 et 3309 mais

le faible nombre de points obtenus pour les modalités Racine_SO4 et Racine_3309 nécessite que ces résultats soient confirmés en répétant l'expérimentation.

Analyse de l'effet cépage sur la composition des populations microbiennes colonisant le plant de vigne

Pour mettre en évidence un éventuel « effet cépage » sur les communautés microbiennes (bactéries et champignons) colonisant les plants de vigne, les profils SSCP issus des modalités porte-greffes 3309, 101-14, et SO4, combinés ou non aux greffons Cabernet Sauvignon ou Sauvignon Blanc, ont été comparés (figure 5).

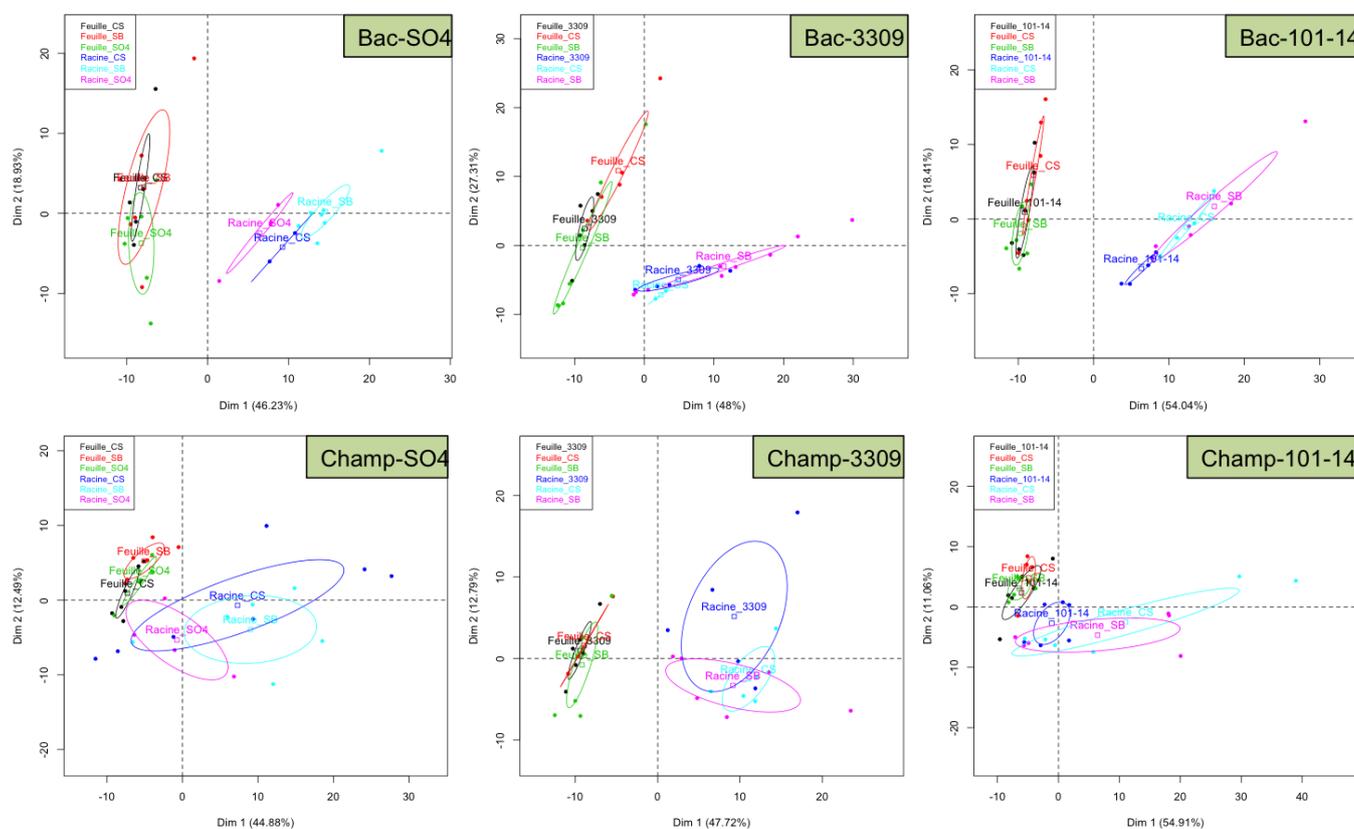


Figure 5 : Analyses en Composantes Principales des communautés fongiques et bactériennes colonisant les feuilles et les racines en fonction des porte-greffes.

Bac : bactéries, Champ : champignons, CS : Cabernet Sauvignon; SB : Sauvignon blanc; 101-14, 3309 et SO4 : porte-greffes. Les deux axes 1 et 2 expliquent 65%, 75%, 72%, 57%, 60% et 66% de la variabilité totale respectivement pour Bac-SO4, Bac-3309, Bac-101-14, Champ-SO4, Champ-3309 et Champ-101-14. Les ellipses correspondent à l'intervalle de confiance à 95%.

Les résultats obtenus montrent que les communautés fongiques des feuilles ou des racines ne sont pas significativement différentes, quel que soit le porte-greffe utilisé. Le même constat est fait pour les flores bactériennes des feuilles. La seule différence concerne la flore bactérienne racinaire du porte-greffe SO4 non-greffé (Racine-SO4 de l'ACP Bac-SO4) (figure 5).

*Influence de l'inoculation de l'agent de biocontrôle *P. oligandrum* sur les communautés microbiennes colonisant les plants*

Pour mettre en évidence un éventuel effet de l'inoculation de *P. oligandrum* sur les communautés microbiennes des feuilles et des racines, les profils SSCP des modalités témoins et inoculées ont été comparées (figure 6).

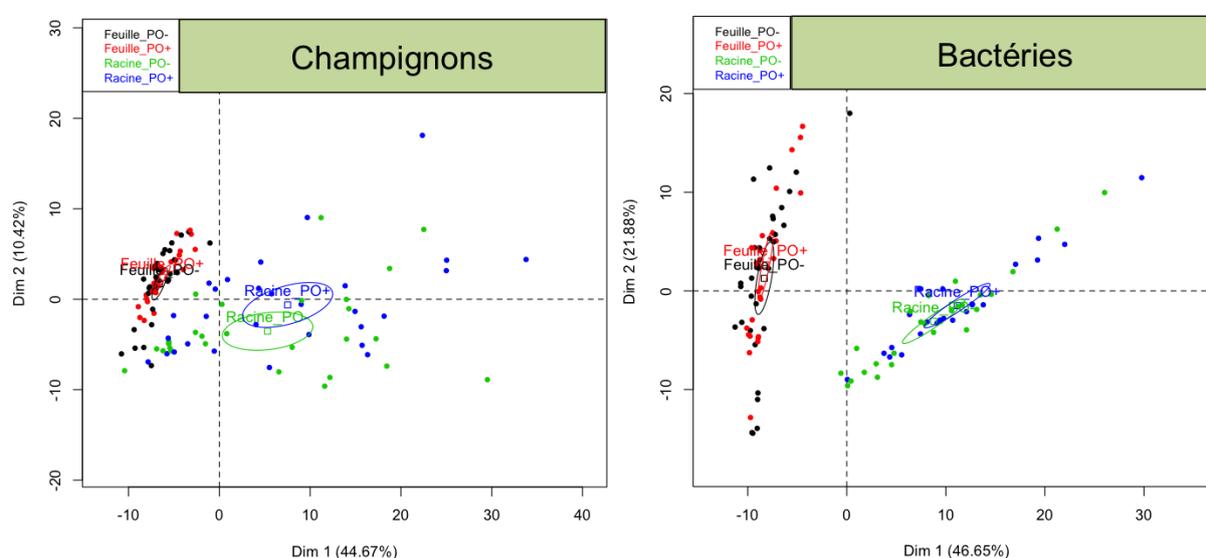


Figure 6 : Analyses en Composantes Principales des communautés fongiques et bactériennes colonisant les feuilles et les racines des plants de vigne ayant été inoculés ou non par *P. oligandrum*.

PO- : plants témoins, PO+ : plants ayant été inoculés par *P. oligandrum*. Le plan principal (axe 1 + axe 2) explique 55% et 68% de la variabilité totale des données, respectivement pour les champignons et les bactéries. Les ellipses correspondent à l'intervalle de confiance à 95%.

Pour les deux modalités, « communautés fongiques ou bactériennes », la distribution des individus sur le plan ne montre aucune différence significative car les ellipses se chevauchent. L'inoculation par *P. oligandrum* ne semble pas influencer sur les communautés microbiennes colonisant les racines et les feuilles des plants de vigne.

4. Discussion et conclusion

Pour que la protection associée à un agent de biocontrôle soit efficace, celui-ci doit s'implanter et persister sur le végétal sur lequel il a été appliqué. Lors de cette étude, il a été montré que dans presque toutes les modalités, *P. oligandrum* a colonisé durant la totalité de l'expérimentation les racines des porte-greffes (SO4, 3309 et 101-14), des cépages (Cabernet Sauvignon et Sauvignon blanc) et des différentes combinaisons porte-greffes/greffon utilisées. Ces résultats obtenus durant une période de 3 mois sont en accord avec l'étude de Yacoub et al. (2016) qui montrent l'aptitude de 3 inocula différents de *P. oligandrum* à coloniser et persister sur les racines des boutures Cabernet Sauvignon durant une durée similaire (4 mois, voir aussi partie I.1 de cette thèse, page 95).

La détection et quantification de *P. oligandrum* sur les racines a été réalisée en utilisant 2 techniques différentes : la microbiologie pasteurienne sur milieu sélectif en boîte de Pétri et la quantification de l'ADN de l'oomycète par PCRq. Ces 2 approches ont été utilisées car, par le passé, elles ont donné des résultats parfois contradictoires mais souvent complémentaires pour comprendre la biologie et la colonisation du système racinaire de tomate (Le Floch et al., 2007 ; Vallance et al., 2009). Dans le cas présent, la même approche sur une autre plante, la vigne, a été appliquée et les 2 méthodes ont permis de détecter *P. oligandrum* dans les mêmes échantillons. Néanmoins, quelques différences notables ont été obtenues. Dans 4 conditions, *i.e.* à T+1 Mois sur racines de SO4 seul, de 101-14 et 3309 greffés au Cabernet Sauvignon, à T+3 Mois avec 101-14 combiné au Sauvignon Blanc, l'oomycète est détecté par PCRq alors qu'il ne l'est pas en microbiologie classique. Ce résultat peut s'expliquer par les propriétés de la PCRq qui est une méthode très sensible, spécifique et plus rapide que les analyses traditionnelles (Lievens et al., 2006). Avec la méthode de microbiologie, lorsqu'une racine est placée dans une boîte de Pétri contenant un milieu de culture, Le Floch et al. (2007) rapportaient que le développement de certains champignons ou oomycètes à croissance rapide pouvait entraver celui d'autres micro-organismes, ce qui expliquerait pourquoi *P. oligandrum* n'est pas détecté dans certains cas. A l'inverse, dans 2 modalités, *i.e.* à T+3 Mois sur racines de 101-14 seul et 3309 greffé au Cabernet Sauvignon, *P. oligandrum* est détecté à des pourcentages très élevés sur les racines, respectivement 86,67% et 92,96%, alors qu'il ne l'est pas en PCRq. Cette différence notable pourrait s'expliquer par la faible quantité de biomasse, 60 mg, utilisée pour quantifier *P. oligandrum* avec la technique moléculaire. Lors de la collecte de racines, le mélange de plusieurs échantillons permet de réduire le risque intrinsèque à ce mode de prélèvement mais

il n'est pas à écarter. Ce biais pourrait certainement être évité dans le futur en mettant au point des analyses qui prendraient en compte des quantités nettement plus grandes de tissus végétaux.

Une autre différence très importante entre les 2 techniques est le fait qu'une baisse de la colonisation racinaire par *P. oligandrum* est observée entre T+1 et T+3 Mois par PCRq pour toutes les modalités, alors que cette observation n'est vérifiée que pour la modalité Sauvignon Blanc greffés avec la microbiologie classique. Ces différences sont là aussi probablement dues aux différences de sensibilité entre ces deux méthodes de détection et de quantification de *P. oligandrum*. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par le Floch et al. (2007). Durant six mois de suivi, ces auteurs avaient montré que les quantités de *P. oligandrum* détectées au niveau des racines des plants de tomate en culture hors-sol diminuaient progressivement durant les 5 premiers mois avant d'augmenter significativement lors du dernier mois de prélèvement, soit 6 mois après l'inoculation par l'oomycète. Cette tendance n'avait pas été observée par méthode culturale, l'oomycète n'étant détecté que durant les 4 premiers mois de l'essai et souvent à des taux relativement faibles.

En utilisant ces deux techniques, principalement la méthode culturale, il a aussi été montré que la colonisation racinaire par *P. oligandrum* est variable selon les associations cépage/porte-greffe étudiées. Chaque porte-greffe avait un taux de colonisation différent selon qu'il était associé, ou non, avec le Sauvignon Blanc et le Cabernet Sauvignon. A T+1 Mois, la modalité porte-greffes/Sauvignon Blanc était plus colonisée par *P. oligandrum* que celle avec le Cabernet Sauvignon, mais cette différence s'estompait à T+3 Mois. Une observation similaire avait été effectuée par Gerbore et al. (2014) lors d'une étude récente sur les populations de *P. oligandrum* présentes dans le vignoble Bordelais. Au vignoble et sans inoculation, l'oomycète avait été détecté sur les racines des 3 porte-greffes utilisés dans la présente expérimentation, tous étaient greffés avec du Cabernet Sauvignon. Le porte-greffe SO4 était cependant le plus intéressant en termes de taux de colonisation racinaire par *P. oligandrum*.

Après avoir vérifié que *P. oligandrum* était présent au niveau des racines de divers plants de vigne, des analyses par empreinte moléculaire (SSCP) ont été réalisées dans le but d'étudier l'impact de l'inoculation de l'oomycète sur la microflore indigène colonisant les ceps.

Les résultats SSCP montrent que, dans toutes les modalités, des microflore fongiques et bactériennes complexes et abondantes colonisaient les feuilles et les racines de jeunes ceps de vigne. Aucun effet direct (sur racines) ou indirect (sur feuilles) associé à l'implantation et à la persistance de *P. oligandrum* au niveau racinaire n'a été observé, un mois après l'inoculation de l'agent de biocontrôle. Ce résultat renforce l'intérêt de cet oomycète comme agent de biocontrôle potentiel chez la vigne. Des travaux similaires réalisés en culture hors-sol de tomate ont également montré que l'inoculation de *P. oligandrum* n'engendrait pas de modifications de la microflore rhizosphérique pouvant provoquer des déséquilibres durables et aux impacts négatifs pour la plante (Vallance et al., 2009). Vallance et al. (2012) avaient uniquement observé des modifications transitoires suivies d'un retour à l'équilibre chez les communautés bactériennes. Ce point mérite d'être souligné car la déstructuration de la microflore peut se traduire par une émergence d'agents pathogènes associés à la diminution de la compétitivité pour la colonisation des niches écologiques ou à un désordre physiologique. *P. oligandrum* ne provoque donc pas de bouleversements significatifs durables chez la microflore colonisant les racines, même si plusieurs publications ont montré qu'il était capable d'interagir et de dégrader de nombreux champignons rhizosphériques (Benhamou et al., 1999). On peut aussi mentionner que certains champignons peuvent eux aussi se défendre contre *P. oligandrum* (Picard et al., 2000) ou même dégrader ses hyphes (Le Floch et al., 2009). Concernant l'effet indirect que *P. oligandrum* pourrait exercer sur la microflore des feuilles, ce phénomène serait lié à la résistance qu'il induit chez le végétal, ce qui modifie sa physiologie et son métabolisme, et au final aurait des répercussions sur certaines microflore, dont celle des feuilles. Ce phénomène ne semble cependant pas exister chez la vigne colonisée par *P. oligandrum*.

Dans le cas présent, les analyses en composantes principales ont montré que la répartition des populations microbiennes était organe-dépendante (Bruez 2013) sans effet du cépage ou du porte-greffe. Cette différence peut provenir de la composition même des tissus, *i.e.* vascularisation, taux de lignification, âge du tissu, et de la nature du milieu dans lequel ils évoluent, *i.e.* tissu racinaire dans le sol, tissu foliaire dans un milieu plus aérien, le sol étant le plus gros réservoir de biodiversité microbienne (Morin et al., 2013).

En conclusion, dans la présente partie, il a été montré que *P. oligandrum* était capable de coloniser les racines des portes greffes, des greffons ainsi que les différentes combinaisons entre ces végétaux. Il n'induit pas de bouleversement au niveau des communautés microbiennes des racines et des feuilles. Ces différents points seront confirmés ou non lors de

la réalisation de nouveaux prélèvements 3 et 18 mois après inoculation (travaux utilisant les mêmes méthodes sont en cours). Dans la suite de cette partie, les réponses de la plante induites consécutivement à l'introduction de *P. oligandrum* sur des racines du porte-greffe SO4 et le développement de *P. chlamydospora* au niveau du greffon de Cabernet Sauvignon seront étudiées par analyses microarrays au niveau des feuilles.

Partie II.2

Protection induite par *Pythium oligandrum* chez
des plants greffés de vigne contre l'attaque par
Phaeoconiella chlamydospora

1. Introduction

Dans la première partie de ce chapitre, il a été montré que *P. oligandrum* colonise le système racinaire de plusieurs porte-greffes, le taux d'implantation de l'oomycète étant toutefois variable selon les modalités et les temps de prélèvements. En se basant sur ces résultats, une expérimentation utilisant des plants combinant le porte greffe SO4 et le cépage Cabernet Sauvignon sera réalisée, l'objectif consistant à évaluer la protection induite par *P. oligandrum* chez ces plants greffés et attaqués par *P. chlamydospora*.

L'évaluation de la colonisation racinaire du SO4 par *P. oligandrum* sera réalisée par méthode cultivable pasteurienne et PCRq. La protection sera évaluée en mesurant le développement des nécroses causées par *P. chlamydospora* et l'ADN du pathogène sera quantifié par PCRq utilisant la technologie Sybr Green. La spécificité de cette technologie est décrite ci-après. L'étude de la réponse transcriptomique globale chez ces plants de vigne greffés sera également effectuée via l'analyse des modifications de l'expression de gènes mises en évidence par microarrays.

Description de la technique PCRq utilisant la technologie Sybr Green

Comme cela a été mentionné dans la partie précédente (partie II.1, page 162), il existe deux systèmes de détection et de quantification du signal fluorescent en PCRq : les sondes fluorescentes, *e.g.* la sonde TaqMan utilisée pour quantifier *P. oligandrum* au niveau racinaire (partie 2.1) et les agents intercalants, *e.g.* le Sybr Green qui va permettre de quantifier *P. chlamydospora* dans cette expérimentation. Ces agents intercalants sont des molécules de plusieurs types, *i.e.* le bromure d'éthidium (Higuchi et al., 1992), le YO-PRO-1 (Ishiguro et al., 1995; Tseng et al., 1997) et le Sybr Green qui est le plus couramment utilisé (Morrison et al., 1998). Ils se lient à l'ADN double brin et l'augmentation de fluorescence consécutive à cette fixation est proportionnelle au nombre de molécules intercalantes, ce qui permet de quantifier l'ADN présent dans un échantillon. La spécificité du Sybr Green repose entièrement sur les amorces utilisées (Bustin, 2000). Les principales étapes de la PCRq utilisant le Sybr Green sont représentées sur la figure 1.

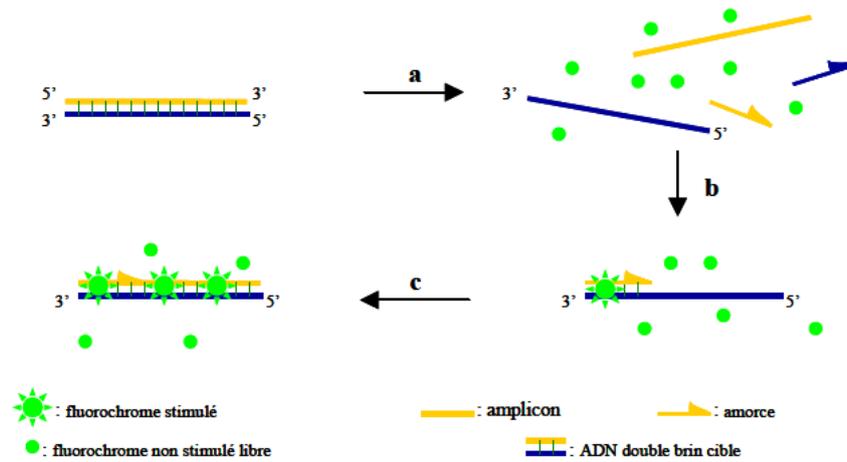


Figure 1: Les principales étapes de la PCRq utilisant l'agent intercalant, le Sybr Green (a) Durant la dénaturation de l'ADN, le Sybr Green libre exhibe peu de fluorescence. (b) À la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN en cours de formation, il en résulte une émission de fluorescence (c) Durant la phase d'élongation le nombre de molécules se liant aux doubles brins naissants est proportionnel à leur formation et l'accroissement de la fluorescence peut alors être suivi en temps réel (Poitras et Houde, 2002).

2. Matériels et méthodes

2.1. Dispositif expérimental

L'essai de protection de plants de vigne greffés par utilisation d'un inoculum de *P. oligandrum*, contre *P. chlamydospora*, a été conduit en 2014. Le dispositif expérimental était le suivant : Des plants greffés, *i.e.* SO4 et Cabernet Sauvignon, âgés d'un an ont été utilisés, sous serre, en conditions contrôlées. Ils ont été répartis en 5 modalités : (i) plants témoins, (ii) témoins percés au niveau de la tige afin de mimer la première étape du processus d'inoculation par *P. chlamydospora*, (iii) plants percés et infectés par le champignon pathogène *P. chlamydospora* au niveau de la tige, (iv) plants dont les racines ont uniquement été inoculées par *P. oligandrum* (v) plants avec les racines inoculées par *P. oligandrum* et la tige infectée par *P. chlamydospora*. Chaque modalité comprend entre 10 et 30 boutures, le nombre le plus élevé est dédié aux conditions où les plants sont inoculés par l'agent pathogène.

2.2. Inoculation des plants greffés de vigne par l'oomycète, *P. oligandrum*

La société Biovitis SA (Saint Etienne de Chomeil, France) a préparé par fermentation en milieu liquide l'inoculum de *P. oligandrum*. Il comprenait une suspension d'oospores et de mycélium de la souche Po37 de cet oomycète. Les plants, au stade 5-6 feuilles, ont été inoculés au niveau des racines avec 50 mL d'inoculum puis, une seconde fois 3 jours plus tard avec à nouveau 50 mL. Dans les 2 cas, la concentration de l'inoculum de *P. oligandrum* était de 10^4 oospores / mL.

2.3. Inoculation des plants greffés de vigne par l'agent pathogène, *P. chlamydospora*

Une semaine après la première inoculation par *P. oligandrum*, l'infection avec *P. chlamydospora* souche SO37 a été réalisée. Pour cela, un disque de mycélium a été déposé au niveau du greffon préalablement percé à 4 mm de profondeur. Afin d'empêcher la pénétration d'autres champignons, le trou a été fermé avec de la paraffine.

2.4. Prélèvement des différents échantillons végétaux à partir des plants greffés de vigne

Pour échantillonner les racines, 9 plants ont été prélevés par modalité à différents temps, à T+2 Mois, soit 2 mois après l'inoculation de l'agent pathogène, à T+3 Mois et à T+4 Mois. Une partie des racines a été utilisée pour la recherche de *P. oligandrum* par méthode microbiologique pasteurienne et l'autre partie a été conservée au -20°C pour les analyses moléculaires par PCRq. Pour les analyses par méthode pasteurienne, les 9 plants prélevés ont été traités séparément, à l'exception des échantillons provenant de boutures non inoculées par *P. oligandrum*, *i.e.* les plants témoins, les témoins percés et ceux infectés par *P. chlamydospora* ont été regroupés de façon aléatoire afin d'obtenir 3 répétitions par modalité. Pour les analyses moléculaires par PCRq, les 9 plants des différentes modalités ont été regroupés pour obtenir 3 répétitions pour chacune d'elle.

Les feuilles ont été prélevées à partir de 9 plants, à deux temps différents, à 0 jpi, c'est-à-dire 2 heures après l'inoculation par l'agent pathogène, et à 14 jpi, soit 14 jours après l'inoculation par *P. chlamydospora*. Pour chaque modalité et pour chaque temps de prélèvement, les feuilles de 9 plants ont été regroupées de façon aléatoire de manière à avoir 3 répétitions par modalité. Les échantillons ont été conservés à -80°C pour les analyses moléculaires ultérieures par microarray.

2.5. Evaluation de l'implantation de *P. oligandrum* au niveau des racines par méthode pasteurienne

La méthode cultivable utilisée pour évaluer la colonisation des racines par *P. oligandrum* est identique à celle décrite dans la partie I.1 page 94).

2.6. Evaluation de l'implantation de *P. oligandrum* au niveau des racines par PCRq

La quantification de *P. oligandrum* par PCRq est identique à celle décrite dans la première partie de ce chapitre (partie II.1, page 167).

2.7. Evaluation de la protection induite par *P. oligandrum* contre *P. chlamydospora*

Cent vingt-cinq jours après l'infection par *P. chlamydospora*, 30 plants (3 répétitions de 10 plants) par modalité ont été prélevés. Pour les modalités où l'agent pathogène n'avait pas été introduit, *i.e.* plants témoins, témoins percés et ceux inoculés uniquement par *P. oligandrum*, 10 plants ont été prélevés. La tige a été sectionnée longitudinalement, une moitié a servi pour mesurer la longueur des nécroses dues à *P. chlamydospora* et l'autre partie a été conservée à -20°C pour quantifier l'ADN de *P. chlamydospora* par PCRq. Le taux de nécroses a été calculé en divisant la longueur de la nécrose par la longueur totale de la tige de la bouture.

Quantification par PCRq de l'ADN de P. chlamydospora au niveau de la tige

Extraction des ADN totaux du bois de vigne

Le greffon et le porte-greffe ont été traités séparément, afin de quantifier *P. chlamydospora* au niveau de chacune des 2 parties de la plante. Les morceaux de bois ont été déshydratés par lyophilisation pendant 24 heures, puis broyées en poudre à l'aide du broyeur Tissue Lyser II (Retsch). A partir des échantillons de bois broyés, des regroupements de 3 échantillons sont effectués pour obtenir 3 répétitions biologiques par condition.

Cent mg de poudres pré-pesés sont ajoutés à 1ml de tampon d'extraction (100mM de Tris-HCl; 20mM EDTA ; 1,4M NaCl ; 2% CTAB; 2% PVPP ; 0,5% v/v β -mercapto-ethanol) et 4 μ l de RNase A (Doyle and Doyle, 1987). Après incubation à 65°C pendant 1h, les tubes sont centrifugés 30 sec à 2000 rpm. Cinq cents μ L de chloroforme isoamyl alcohol 24 :1 sont ajoutés au mélange et homogénéisés par renversement des tubes puis incubés 5 min dans la glace. Une étape de centrifugation à 4°C pendant 10 minutes à 14000 rpm permet de différencier trois phases : (i) la solution de chloroforme ayant mobilisé les composés hydrophobes, surmontée (ii) d'un disque blanchâtre contenant le CTAB, le PVPP, les composés complexés par ces 2 derniers, ainsi qu'une fraction de protéines et des débris végétaux et (iii) les molécules d'intérêts, comme l'ADN qui est hydrophile et mobilisé dans la phase aqueuse qui est translucide. Quatre cents μ L de surnageant sont prélevés et mélangés à 130 μ L du tampon P3 (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen) puis incubés 5 min dans la glace. La suite du protocole est réalisée à l'aide du matériel fourni par le kit. Le lysat (530 μ L) est transféré dans une mini colonne QIAshredder puis centrifugé 2 min à 14000 rpm. Le filtrat est

transféré dans un tube stérile et mélangé par pipetage à 800 µL de tampon AW1. Le mélange de 650µL est ensuite introduit 2 fois dans la colonne DNeasy (1 min à 6000 rpm), elle possède une membrane en silice avec une forte affinité pour l'ADN dans les conditions physico-chimiques du tampon AW1 (concentrations en sels chaotropiques et en éthanol élevées). Cette affinité est plus forte pour l'ADN que pour d'autres composés, tels que les polysaccharides, les protéines et les polyphénols. Les étapes de lavage visent à éliminer ces composés. La colonne est placée dans un Collection Tube et 500 µL de tampon de lavage AW2 sont ajoutés sur la colonne et incubés 5 min à température ambiante. Après 1 min de centrifugation à 6000rpm, le filtrat est éliminé. Un second lavage est effectué par addition de 500 µL de tampon AW2 suivi de 5 min d'incubation à température ambiante et d'une centrifugation à 14000 rpm pendant 2 min. La colonne est transférée dans un nouveau tube stérile et 50 µL de tampon d'éluion AE sont déposés sur la membrane de la colonne. Après 5 min d'incubation à température ambiante, l'ADN est élué par centrifugation à 14000 rpm pendant 2 min. Les échantillons d'ADN obtenus sont stockés à -20°C (Pouzelet, 2012).

Extraction de l'ADN de *P. chlamydospora*

Afin de réaliser une gamme étalon pour la PCRq, le mycélium de cultures de *P. chlamydospora* âgées de 3 à 4 semaines est prélevé stérilement à l'aide d'un scalpel et placé dans un tube eppendorf de 1,5 mL. Le protocole d'extraction est identique à celui utilisé pour l'extraction de l'ADN de *P. oligandrum*, il a été décrit dans la partie II.1 en page 168.

Quantification de l'ADN de *P. chlamydospora* par PCRq

Les réactions de PCRq sont préparées dans un volume final de 25 µL. Le mélange réactionnel contient 12,5 µL de 2X Sybr® Green Quantitect® Master Mix (Qiagen), 0,6 µL de chacune des amorces (20µM) et 9,3 µL d'eau sans nuclease. Deux µL de solution d'ADN sont utilisés par réaction. Le programme consiste en une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 15 min suivie de 40 cycles de dénaturation à 95°C pendant 15 sec, puis une phase d'hybridation et d'élongation à 62°C pendant 45 sec est réalisée ainsi qu'une analyse du point de fusion allant de 60 à 95°C (Pouzelet et al., 2013). La gamme standard est composée de 8 dilutions allant de 730 ng. µL⁻¹ à 7,3.10⁻⁵ ng. µL⁻¹.

Etude de la réponse transcriptomique globale des plants greffés de vigne par microarray

Pour les différents traitements, l'analyse microarray a été effectuée au niveau foliaire 2h (0 jpi) et 14 jours (14 jpi) après l'infection par l'agent pathogène.

Extraction des ARN totaux des feuilles de vigne

L'extraction des ARNs est réalisée à partir des feuilles prélevées et stockées à -80°C. Après broyage dans l'azote liquide, 2 ml de tampon d'extraction préchauffé à 56°C (300 mM Tris HCl, pH 8.0 ; 25 mM EDTA ; 2 mM NaCl ; 2% CTAB ; 2% poly-vinyl poly-pyrrolidone (PVPP) ; 0,05% de spermidine trihydrochloride et 2% β mercaptoéthanol ajouté extemporanément d'après Reid et al. (2006) est ajouté à la poudre de feuilles. Le mélange est agité vigoureusement et incubé dans un bain marie pendant 20 min à 56°C, puis placé sous agitation toutes les 2 minutes. Un volume égal d'un mélange chloroforme: isoamyl alcohol (24:2 ; v/v) est ajouté puis centrifugé à 3500 g (5000 rpm) pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube. L'extraction et la purification des ARNs sont alors réalisées avec un kit, le Spectrum Total Plant RNA Kit (Sigma-Aldrich). Les ARNs sont capturés sur une colonne d'affinité à l'aide d'une solution « Binding » unique, qui empêche efficacement les polysaccharides ainsi que l'ADN génomique de colmater la colonne. Les impuretés résiduelles et l'ADN génomique sont éliminés par lavage, et l'ARN purifié est élué dans de l'eau libre de RNase. Si les échantillons d'ARN préparés contiennent des traces de l'ADN génomique, un traitement DNase est appliqué directement sur la colonne, avant l'élué des ARNs. La pureté des ARNs a été évaluée en mesurant les rapports d'absorbance à 260/280 (contamination en protéines) et à 260/230 (contamination en molécules organiques) avec un Nanodrop (ND-1000, Thermoscientific, Labtech Nanodrop). Si la pureté est correcte, les valeurs des 2 rapports doivent être supérieures à 1,8. Après ce premier niveau de contrôle, l'intégrité, c'est-à-dire la mesure du niveau de dégradation des ARNs extraits, a été mesurée au Bioanalyzer (Agilent).

Analyses microarrays

Le traitement des données pour les analyses bioinformatiques et statistiques ont été décrites dans la partie I.2. en page 115.

3. Résultats

3.1. Evaluation de l'implantation de *P. oligandrum* au niveau des racines de plants greffés de vigne par méthode pasteurienne

Aucun fragment de racines provenant de plants témoins n'a été colonisé par l'oomycète pour les 3 temps de prélèvement considérés, *i.e.* 2, 3 et 4 mois après l'inoculation de certaines boutures par l'agent pathogène. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1. Evaluation par méthode pasteurienne du pourcentage (\pm erreur standard) de colonisation racinaire par *P. oligandrum* chez des plants greffés (Cabernet Sauvignon + SO4). Les valeurs avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $p < 0,05$ selon le test de Kruskal-Wallis. T+2 Mois, T+3 Mois et T+4 Mois : prélèvements respectivement 2, 3 et 4 mois après l'inoculation par le pathogène.

Colonisation racinaire par <i>P. oligandrum</i> (%)			
T+2 Mois	<i>P. oligandrum</i>	52.59	\pm 12.14 a
	<i>P. oligandrum</i> + <i>P. chlamydospora</i>	55.56	\pm 10.42 a
T+3 Mois	<i>P. oligandrum</i>	17.37	\pm 9.13 a
	<i>P. oligandrum</i> + <i>P. chlamydospora</i>	30.00	\pm 12.47 a
T + 4 Mois	<i>P. oligandrum</i>	30.49	\pm 12.42 a
	<i>P. oligandrum</i> + <i>P. chlamydospora</i>	44.44	\pm 17.57 a

Les résultats montrent que *P. oligandrum* a colonisé les plants de vigne durant la durée complète de l'expérimentation (tableau 1). Les valeurs les plus élevées étaient observées à T+2 Mois, 52,59% des racines étaient colonisées par l'oomycète dans la modalité « plants inoculés avec *P. oligandrum* » et 55,56% pour les plants inoculés par les 2 microorganismes. A T+3 Mois, la tendance a évolué et les valeurs ont baissé, principalement pour la modalité « *P. oligandrum* » avec 17,37% des racines colonisées. Concernant le dernier prélèvement à T+4 Mois, les taux de colonisation racinaire par *P. oligandrum* ont augmenté sans atteindre ceux mesurés lors du premier prélèvement. Aucune différence significative n'a cependant été observée entre les différentes modalités.

3.2. Evaluation par PCR quantitative de l'implantation de *P. oligandrum* au niveau des racines de plants de vigne greffés

P. oligandrum a uniquement été détecté dans les modalités où il avait été introduit au préalable au niveau du système racinaire. Les taux de colonisation racinaires par l'oomycète sont relativement stables au cours du temps.

Tableau 2 : Evaluation par PCR quantitative de la colonisation racinaire de *P. oligandrum* chez des plants greffés (Cabernet Sauvignon + SO4).

Les variables sont exprimées en quantités moyennes d'ADN (\pm erreur standard) de *P. oligandrum*. Les valeurs avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $p < 0,05$ selon le test de Kruskal-Wallis. T+2 Mois, T+3 Mois et T+4 Mois : prélèvements respectivement 2, 3 et 4 mois après l'inoculation par le pathogène. Pas de différences significatives entre les traitements.

		Quantité de <i>P. oligandrum</i> (pg/ μ l)	
T+2 Mois	<i>P. oligandrum</i>	$9.28 \cdot 10^{-2} \pm 7.24 \cdot 10^{-2}$	a
	<i>P. oligandrum</i> + <i>P. chlamydospora</i>	$3.78 \cdot 10^{-2} \pm 1.24 \cdot 10^{-2}$	a
T+3 Mois	<i>P. oligandrum</i>	$3.14 \cdot 10^{-2} \pm 2.18 \cdot 10^{-2}$	a
	<i>P. oligandrum</i> + <i>P. chlamydospora</i>	$1.14 \cdot 10^{-2} \pm 6.60 \cdot 10^{-3}$	a
T + 4 Mois	<i>P. oligandrum</i>	$3.82 \cdot 10^{-2} \pm 3.10 \cdot 10^{-2}$	a
	<i>P. oligandrum</i> + <i>P. chlamydospora</i>	$1.21 \cdot 10^{-2} \pm 6.34 \cdot 10^{-3}$	a

Les quantités les plus élevées ont été détectées à T+2Mois : $9,28 \cdot 10^{-2}$ pg/ μ L pour les plants inoculés avec *P. oligandrum* et $3,78 \cdot 10^{-2}$ pg/ μ L pour ceux inoculés avec les 2 microorganismes. A T+4 Mois et T+3 Mois, les niveaux de colonisation racinaire par l'oomycète ont baissé pour les 2 modalités et ils sont homogènes entre les 2 temps de prélèvement. Cependant, les différences ne sont pas statistiquement significatives (tableau 2).

3.3. Protection induite par *P. oligandrum* chez des plants greffés de vigne contre une attaque par *P. chlamydospora*

Afin d'évaluer la capacité de *P. oligandrum* à induire une protection chez de jeunes plants greffés de vigne contre l'attaque *P. chlamydospora*, la taille des nécroses causées au niveau des tiges par ce pathogène a été mesurée (figure 2).

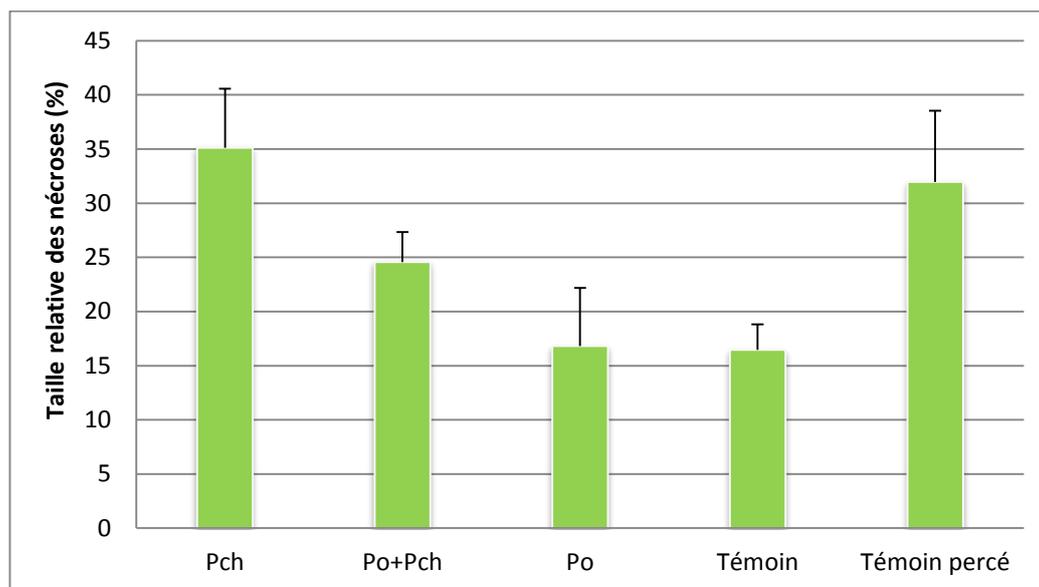


Figure 2 : Evaluation du développement des nécroses dans la tige des plants greffés (Cabernet Sauvignon + SO4) 4 mois après l'inoculation par *P. chlamydospora*. Les valeurs indiquées correspondent aux moyennes de la taille des nécroses (en %) (\pm erreur standard) mesurées chez les plants. Po = plants traités par *P. oligandrum* ; Pch = plants infectés par *P. chlamydospora* ; Po+Pch= plants traités par les 2 microorganismes.

La présence naturelle de nécroses a été observée chez tous les plants témoins, *i.e.* pour les 3 modalités : plants témoins (17%), témoins percés (32%) et ceux inoculés par *P. oligandrum* uniquement (17%) (figure 2). Une tendance à la réduction de la longueur des nécroses chez les plants colonisés au niveau de la rhizosphère par *P. oligandrum* (Po + Pch ; 24%) en comparaison à la modalité *P. chlamydospora* (Pch ; 35%) a été observé. Les différences entre les modalités ne sont pas significatives.

Quantification de *P. chlamydospora* au niveau de la tige par PCRq

La quantification des ADN de *P. chlamydospora* montre que les quantités normalisées de *P. chlamydospora* détectées au niveau des greffons sont plus importantes que celles mesurées au niveau des porte-greffes (figure 3).

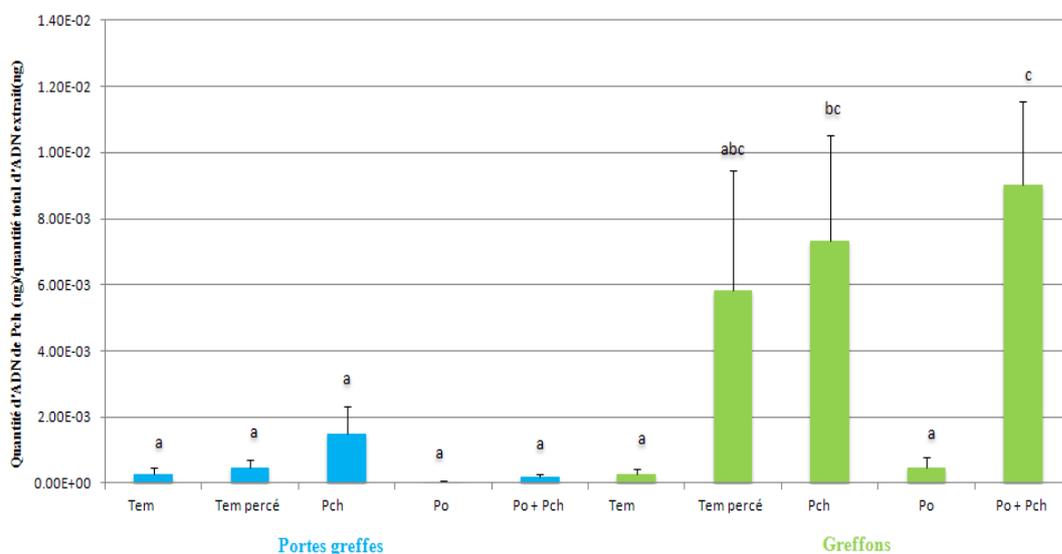


Figure 3: Evaluation des quantités d'ADN de *P. chlamydospora* au niveau des porte-greffes (en bleu) et du greffon (en vert) par PCR quantitative, 4 mois après l'inoculation par l'agent pathogène.

Les valeurs correspondent aux rapports des moyennes des quantités d'ADN détectées (\pm erreur standard) dans 3 répétitions biologiques normalisées sur les quantités d'ADN totaux. Tem : témoin, Tem percé : témoin percé, Pch : *P. chlamydospora*, Po : *P. oligandrum* et Po+Pch : *P. oligandrum* + *P. chlamydospora*. Les valeurs avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à $p < 0.05$ selon le test de Kruskal-Wallis.

Au niveau du greffon, l'ADN de l'agent pathogène a été détecté dans toutes les modalités. Cependant, la quantité d'ADN de *P. chlamydospora* détectée est significativement plus importante dans les modalités où ce champignon a été inoculé (Pch et Po+Pch) par rapport aux autres conditions, à l'exception de la modalité « témoin percé ». La présence de *P. oligandrum* au niveau des racines n'est pas associée à une diminution de la quantité d'ADN de *P. chlamydospora* dans les greffons.

Au niveau du porte-greffe, les quantités d'ADN du pathogène chez les boutures inoculées par l'oomycète et *P. chlamydospora* sont relativement plus faibles par rapport à celles observées au niveau des plants inoculés uniquement par le champignon pathogène.

Aucune différence significative entre les différentes modalités au niveau des porte-greffes n'a cependant été observée.

3.4. Etude de la réponse transcriptomique globale des jeunes plants greffés de vigne par microarray

Les modifications transcriptionnelles chez les jeunes plants de vigne greffés en réponse aux inoculations par *P. oligandrum* au niveau des racines et *P. chlamydospora* dans la tige ont été étudiées par analyse microarray. Elles ont été effectuées avec les échantillons foliaires prélevés 2 heures (0 jpi) et 14 jours (14 jpi) après l'inoculation par l'agent pathogène.

L'analyse globale des gènes significativement modulés au cours du temps (entre 0 et 14 jpi) au niveau des différentes modalités est présentée sur un diagramme de Venn. Cette représentation permet de mettre en évidence le nombre de gènes spécifiques et communs à chaque modalité (figure 4).

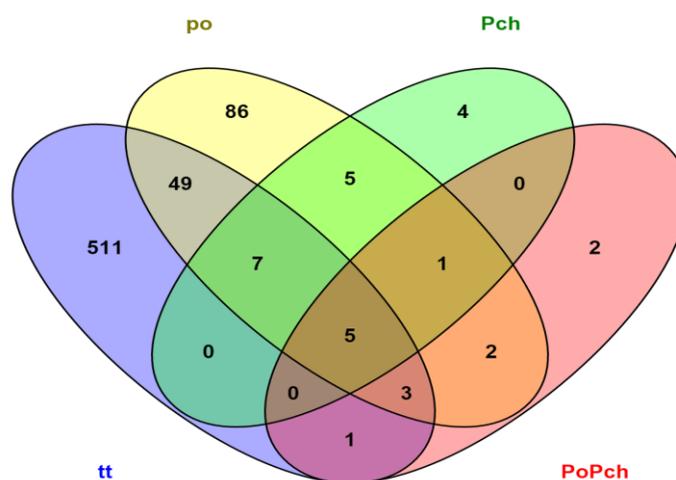


Figure 4 : Diagramme de Venn indiquant le nombre de gènes différentiellement exprimés au cours du temps. Comparaison des temps à 2h (0 jpi) et 14 jours (14 jpi) post-inoculation par l'agent pathogène.

Po = *P. oligandrum*, Pch = *P. chlamydospora*, tt = témoin percé. Test statistique de Limma à $p < 0,05$.

Lorsque les différentes modalités sont considérées dans leur globalité, entre 0 et 14 jpi, 676 gènes des feuilles expriment un changement significatif au niveau de leur expression. Les « plants témoins percés » constituent la modalité où le nombre de gènes dont l'expression est modifiée est la plus importante : 511 gènes sont spécifiques à ce traitement et 65 sont communs avec les autres conditions. Le traitement avec *P. oligandrum* induit l'expression différentielle de 159 gènes : 86 sont spécifiques et 73 sont communs. Concernant, les plants infectés par *P. chlamydospora* et pré-inoculés ou non par *P. oligandrum*, le nombre de gènes différentiellement exprimés est très faible : 22 gènes montrent des variations d'expression entre 0 et 14 jpi chez les plants infectés par *P. chlamydospora* et 14 gènes chez ceux inoculés avec les deux microorganismes (figure 4).

Les catégories fonctionnelles de gènes avec un différentiel d'expression statistiquement significatif ($p < 0,05$) ont été recherchées. Dix-sept catégories fonctionnelles, *e.g.* organisation cellulaire, stress biotique, récepteurs kinases, sérine protéase, synthèse et dégradation du métabolisme carbohydate, etc. ont ainsi été identifiées chez la modalité « témoin percé ». Pour les plants inoculés par l'oomycète seul, 4 catégories fonctionnelles se démarquent, celle qui est la plus exprimée regroupe les gènes de régulation des facteurs de transcriptions des ARN des voies de signalisation de l'éthylène et de l'acide jasmonique (Apetala2 Ethylene-responsive element binding protein ou Apetala2 EREBP). Cette catégorie de gènes est plus induite à 0 jpi qu'à 14 jpi. Pour les plants, infectés par *P. chlamydospora* et prétraités ou non par *P. oligandrum*, aucune catégorie fonctionnelle n'a été exprimée de façon significative.

Les analyses Mapman permettent de représenter sur une même figure les gènes impliqués dans le stress biotique et qui sont significativement surexprimés (en rouge) ou réprimés (en vert) au cours du temps (figure 5).

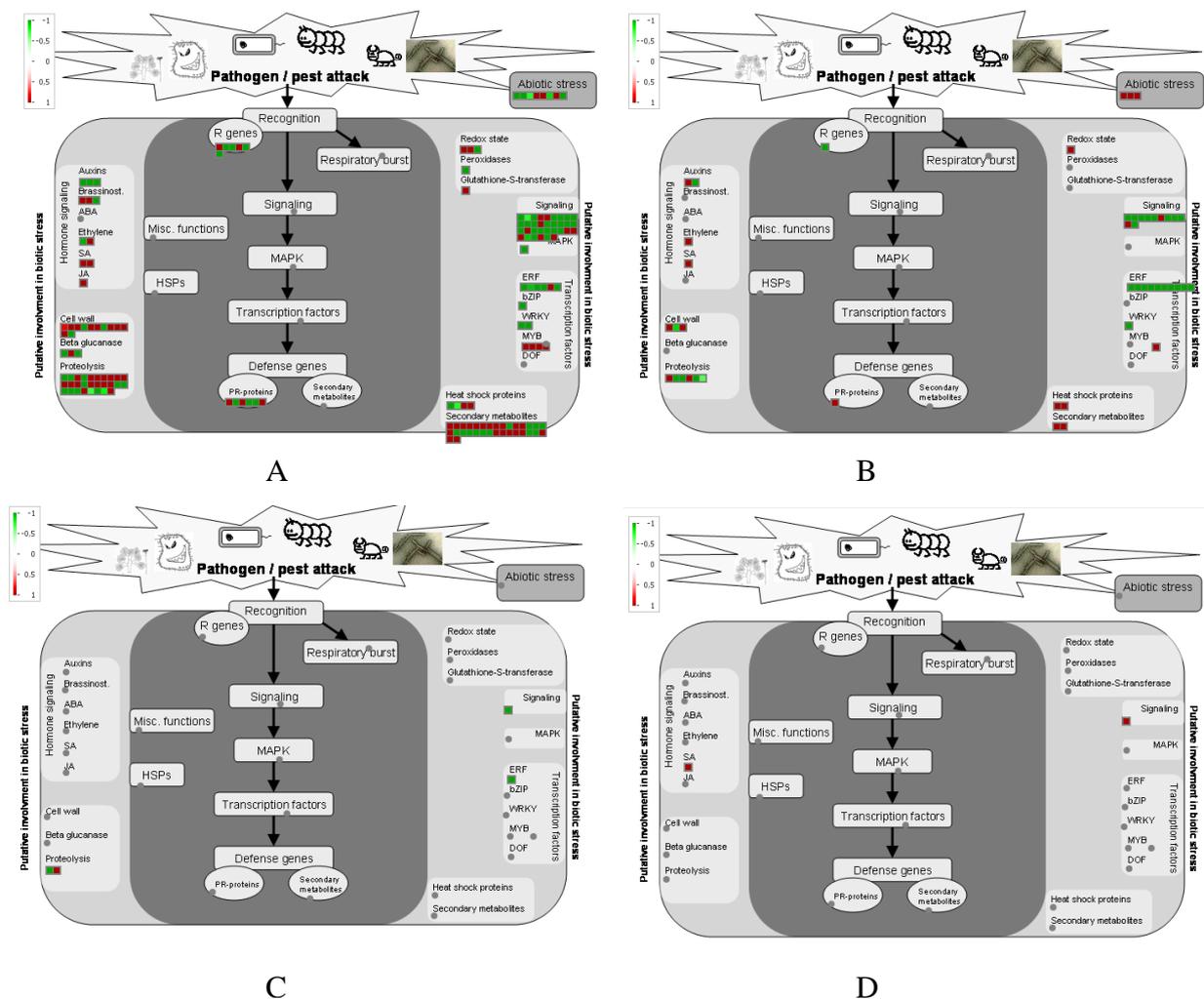


Figure 5: Visualisation par Mapman des gènes assignés aux catégories fonctionnelles du stress biotique et différentiellement exprimés au cours du temps 2h (0 jpi) et 14 jours (14 jpi). A : plants témoins percés, B : plants traités avec *P. oligandrum*, C : plants infectés par *P. chlamydospora* et D : plants traités par *P. oligandrum* et infectés par *P. chlmaydospora*. Chaque carré représente un gène. Carré rouge : gène induit à 14 jpi. Carré vert : gène plus induit à 0 jpi.

En réponse au perçage des plants témoins, des gènes appartenant aux différentes catégories fonctionnelles, *i.e.* gènes de résistance, métabolisme des hormones, facteurs de transcription, voies de signalisation, protéolyse et renforcement de la paroi cellulaire, sont différentiellement exprimés. Par exemple chez ces végétaux, 6 gènes codant pour des protéines PR (3 gènes sont induits et 3 autres montrent une tendance vers la répression) et 6 R-gènes (4 sont réprimés et 2 sont induits) sont différentiellement exprimés. Les gènes impliqués dans les voies de signalisation sont réprimés au cours du temps alors que ceux codant pour les métabolites secondaires montrent une tendance vers l'induction.

L'inoculation des plants par *P. oligandrum* seul, entraîne une sous expression au cours du temps de la majorité des gènes impliqués dans les voies de signalisation (récepteurs kinases) et des facteurs de transcription (Ethylene Receptor Factor). Les gènes impliqués dans la production de métabolites secondaires et la signalisation hormonale sont peu exprimés en réponse à l'inoculation par *P. oligandrum*. Pour les plants infectés par *P. chlamydospora*, ou traités par les deux microorganismes, les gènes de la plante impliqués dans le stress biotique ne sont pas différenciellement exprimés au cours du temps.

4. Discussion et conclusions

Dans la littérature, plusieurs expérimentations de lutte biologique contre les maladies du bois ont été réalisées en utilisant un modèle simplifié, ou pieds-franc, de plants de vigne (Bruez et al., 2015; Fourie and Halleen, 2001 ; 2006 ; Haidar et al., 2016 ; Yacoub et al., 2016). A notre connaissance, aucune étude détaillée sur la résistance induite par des micro-organismes chez des vignes greffées n'a été réalisée. La présente expérimentation, sur l'aptitude de *P. oligandrum* à protéger des plants greffés contre *P. chlamydospora*, apportera donc des informations importantes sur ce sujet.

Dans un premier temps, la colonisation racinaire au cours du temps a été vérifiée par méthode culturale et par PCRq. L'oomycète s'est implanté sur les racines des jeunes plants greffés, *i.e.* celles du porte-greffe SO4, et a persisté durant toute la période de l'expérimentation (4 mois). Ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus par Gerbore et al. (2014b), qui avaient montré qu'au vignoble, *P. oligandrum* colonisait le système racinaire du porte-greffe SO4 associé au greffon de Cabernet Sauvignon. Des résultats similaires avaient aussi été obtenus sur d'autres plants greffés avec la même combinaison porte-greffe/greffon dans la première partie de ce chapitre. L'ensemble de ces résultats démontre et confirme l'aptitude de cet oomycète à coloniser la rhizosphère de ce type de plants.

Ce point sur la colonisation des racines étant vérifié, l'effet protecteur de *P. oligandrum* a été évalué. Fréquemment dans la littérature, la taille des nécroses permet de mesurer le niveau d'attaque par *P. chlamydospora* sur les plants de vigne pieds-francs (Billones-Baaijens et al., 2014; Eskalen et al., 2001; Gubler et al., 2004; Laveau et al., 2009; Sparapano et al., 2001 ; Pouzoulet et al., 2013). Dans le cas présent, cette méthode d'observation visuelle n'est pas vraiment adaptée car les plants greffés témoins développent naturellement des nécroses à partir du point de greffe. Néanmoins, chez les plants inoculés avec *P. oligandrum* puis le pathogène, des nécroses ayant une taille réduite par rapport aux plants infectés par *P. chlamydospora* seul ont été observées.

Dans un second temps, afin de préciser ce phénomène de protection, une quantification par PCRq de l'ADN de *P. chlamydospora* au niveau du bois a été effectuée. Cette méthode a été déjà utilisée par Barrie et al. (2004) et surtout Pouzoulet et al. (2013) afin de développer un outil de détection et de quantification de cet agent pathogène dans le bois. Dans la présente expérimentation, il a été montré que *P. chlamydospora* était naturellement présent au niveau des porte-greffes et greffons qui n'avaient pas été inoculés par ce

champignon. Ces résultats confirment les études de plusieurs auteurs qui montraient que *P. chlamydospora* était naturellement présent au niveau des plants greffés en pépinière et au vignoble (Bruez et al., 2015 ; Fourie and Halleen., 2004 ; Gimenez-Jaime et al., 2006 ; Zanzotto et al., 2007). Pouzoulet et al. (2013) ont ainsi montré que le champignon pathogène était détecté au niveau du point de greffe de 26% des plants analysés dans leur expérimentation. Dans notre cas, il faut toutefois mentionner que les quantités de *P. chlamydospora* détectées dans les différents plants témoins étaient relativement faibles, à l'exception de la modalité « témoin percé » où elles étaient équivalentes à celles mesurées chez les plants inoculés artificiellement avec le pathogène. Ce résultat pourrait être attribué à l'effet perçage, le trou au niveau du greffon constitue en effet une voie d'entrée et donc de contamination par l'agent pathogène. Dans toutes les modalités, les quantités d'ADN de *P. chlamydospora* détectées au niveau du greffon étaient plus importantes que dans le porte-greffe. Ces résultats concordent bien avec ceux obtenus par Pouzoulet et al. (2013) qui montrent que, 2 mois après l'infection, la quantité de *P. chlamydospora* diminue en s'éloignant du site d'inoculation au niveau du greffon.

La colonisation des racines par *P. oligandrum* n'est pas associée à une diminution des quantités d'ADN du pathogène dans le greffon. Deux explications peuvent être avancées pour expliquer ce résultat : (i) D'après Laveau et al. (2009), *P. chlamydospora* est un agent pathogène qui cause des nécroses de 4 cm de longueur, 5 mois après son inoculation chez des boutures de vigne. Dans notre étude, la taille du greffon utilisée était réduite, 2 à 3 cm de longueur, par conséquent au bout de 4 mois, *P. chlamydospora* a pu coloniser l'ensemble du greffon dans les deux conditions, *i.e.* inoculation avec Pch et avec Po puis Pch. Même si une réduction de 50% du développement des nécroses était obtenue, comme cela a été rapporté par Yacoub et al. (2016 ; voir aussi partie I.1 page 95), l'effet protecteur du à *P. oligandrum* ne pouvait pas être observé. (ii) La méthode de PCRq utilisée repose sur la quantité d'ADN du pathogène. Ces ADN peuvent provenir d'hyphes vivants, dépérissants ou même morts. Afin de quantifier uniquement les filaments fongiques en pleine croissance, la quantification des ARN de *P. chlamydospora* par PCRq serait une alternative intéressante et permettrait de montrer sans ambiguïté un éventuel effet de *P. oligandrum* sur les plants infectés par l'agent pathogène.

Si un effet protecteur n'est pas clairement observé par PCRq dans le greffon, en s'éloignant du point d'inoculation et en quantifiant l'ADN du pathogène dans le porte-greffe, une diminution de celui-ci est mesurée chez les plants inoculés avec *P. oligandrum*.

Cependant, les quantités d'ADN détectées au niveau du porte-greffe pour toutes les modalités sont très faibles et ces différences ne sont pas statistiquement significatives.

En résumé pour cette première partie de l'expérimentation, la méthode de lecture des nécroses et la quantification de l'ADN de l'agent pathogène dans le porte-greffe indiqueraient qu'un effet protecteur du à *P. oligandrum* serait vraisemblablement mis en place dans les plants greffés. Afin d'obtenir des informations supplémentaires sur cette triple interaction, une étude, entre T0 et T14, de la réponse transcriptomique globale de la vigne a été réalisée. Dans le cas présent, les réponses de la plante ont été étudiées au niveau foliaire alors qu'elles l'étaient au niveau du tronc dans le chapitre I. Nos résultats montrent que la méthode d'inoculation de *P. chlamydozoa*, *i.e.* le perçage de la tige, induit un stress important chez la plante comme l'indique l'expression différentielle de 576 gènes au niveau foliaire. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus précédemment (chapitre I.2, page 117) avec les plants pieds-francs (expression différentielle de 1371 gènes). Le stress appliqué à la plante était maximal dans la tige, puisque le perçage est effectué à ce niveau, il semble donc logique qu'un nombre plus important de gènes y soit aussi différentiellement exprimé.

L'inoculation de *P. oligandrum* au niveau des racines est associée à l'expression de 156 gènes au niveau foliaire. Lors d'une expérimentation utilisant des boutures de Cabernet Sauvignon pieds-francs, Gerbore (2013) a montré que cet oomycète induit l'expression de 1916 au niveau racinaire. Nos résultats obtenus dans la partie I.2 (page 117) montrent que cet agent de biocontrôle induit l'expression différentielle de 189 gènes au niveau du tronc des boutures de Cabernet sauvignon. Une décroissance dans le nombre des gènes exprimés, depuis les racines jusqu'au feuilles, semble donc caractériser cette interaction, hypothèse qui demande néanmoins à être vérifiée. On peut aussi souligner le fait que pour la première fois, une réponse transcriptomique foliaire consécutive à la colonisation des racines par un micro-organisme, ici *P. oligandrum*, a été observée chez des plants formés par l'association d'un porte-greffe et d'un greffon. Parmi les gènes foliaires différentiellement exprimés, la catégorie fonctionnelle qui ressort est celle qui regroupe les gènes codant pour les facteurs de transcriptions impliqués dans les voies de signalisation de l'éthylène et l'acide jasmonique (Apetala2 EREBP). Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, la résistance systémique induite est associée à l'induction de certains gènes codant pour des facteurs de transcription, dont les Apetala2 EREBP (Memlink, 2009 ; Pieterse et al., 2014). Ici, ces gènes sont fortement induits à 0 jpi soit, 7 jours après inoculation par l'oomycète et 2 heures après l'infection par *P. chlamydozoa*. Ce résultat est intéressant, car les analyses microarrays

effectuées au niveau de la tige des plants pied-francs de Cabernet Sauvignon montrent que cette catégorie fonctionnelle est aussi significativement induite à 0 jpi (partie I.2., page 117). Ces résultats sont également cohérents avec les travaux de Takahashi et al. (2006) et Kawamura et al. (2009) qui rapportaient que l'application du *P. oligandrum*, ou de ses protéines élicitrices, sur la plante active la voie de signalisation de l'acide jasmonique et celle de l'éthylène. Ces expressions spécifiques de gènes pourraient être associées à la mise en place de la potentialisation qui caractérise de nombreuses interactions plantes/*P. oligandrum*.

L'infection des jeunes plants greffés par *P. chlamydospora* en présence ou non de *P. oligandrum* induit de très faibles modifications transcriptomiques au niveau foliaire. Plusieurs travaux antérieurs ont cependant montré que l'inoculation des agents pathogènes des MDB au niveau du tronc induisaient des modifications de l'expression de gènes foliaires, certains étaient utilisés comme marqueurs de l'état de défense de la plante (Belle, 2012 ; Camps et al., 2010 ; Cezmmel et al., 2015). Dans notre cas, parmi les raisons qui expliqueraient cette absence de réponse, on peut citer : (i) les modifications transcriptionnelles chez *V. vinifera* ont été analysées en comparant 2 temps (0 et 14 jpi). Or le perçage de trous suivi de l'infection par l'agent pathogène dans le greffon a induit un très fort état de stress qui s'est peut-être maintenu durant toute période de prélèvement (0 à 14 jpi). Cette forte réponse aurait masqué celles liées à la colonisation par *P. chlamydospora* et *P. chlamydospora* + *P. oligandrum* (ii) Chez les vignes témoins traitées avec uniquement *P. oligandrum*, les réponses des plants greffés sont en phase avec ce qui est habituellement observé chez les divers végétaux colonisés avec ce micro-organisme. Or, dans cette condition les vignes greffées ne sont pas spécialement stressées car elles ne sont pas percées au niveau du greffon, ce qui est en faveur de l'hypothèse énoncée ci-avant. (iii) Les plants greffés utilisés étaient trop petits au niveau du greffon, ce qui accentue l'effet du perçage suivi de l'infection par *P. chlamydospora*. De futures expérimentations devront être réalisées avec des plants qui ont des tailles beaucoup plus importantes, surtout au niveau de la partie supérieure, le greffon.

En conclusion, l'oomycète a confirmé ses capacités à coloniser durablement les racines des jeunes plants de vigne greffées, *i.e.* le porte-greffe SO4 combiné au cépage Cabernet Sauvignon. Une tendance à la protection induite par *P. oligandrum* a été observée au niveau des nécroses et par quantification de l'ADN de *P. chlamydospora* dans le porte-greffe. L'analyse transcriptomique par microarrays au niveau foliaire ne nous a pas permis de caractériser l'interaction tripartite *V. vinifera*, *P. oligandrum* et *P. chlamydospora*, l'effet du perçage au niveau du tronc ayant certainement induit un stress très fort qui a masqué nombre

de réponses géniques de la plante. Néanmoins, chez ces plants greffés, pour la première fois, une réponse transcriptomique foliaire consécutive à la colonisation des racines par *P. oligandrum* a été décrite.

Conclusions générales et perspectives

Les viticulteurs, comme l'ensemble des acteurs du monde agricole, sont actuellement très fortement incités à utiliser d'autres moyens de protection des plantes que les produits phytosanitaires issus de la synthèse chimique. Cette orientation, aussi louable soit elle, crée des impasses techniques au niveau de la protection des plantes, aucun pesticide ou méthodes de lutte n'étant disponible pour lutter avec un haut niveau d'efficacité contre certaines maladies. C'est le cas des maladies du bois (MDB) de la vigne depuis l'interdiction de l'arsénite de sodium en 2001 en France. Sans qu'un lien entre le retrait de cette molécule et la progression constante de ces pathologies dans les vignobles ait été formellement établi, cette situation génère une inquiétude croissante chez les viticulteurs. Récemment, la filière viticole souhaitait même classer ces dépérissements comme « cause nationale ». Parmi les méthodes alternatives possibles, le biocontrôle est encouragé, promu par les pouvoirs publics et en plein essor au niveau industriel et scientifique. Contre les MDB, un produit de biocontrôle, nommé Esquive dont la matière active est un champignon antagoniste, *Trichodema atroviride*, a été homologué en 2013 contre l'eutypiose, puis contre l'esca en 2014.

Dans la présente étude, un oomycète, *P. oligandrum*, naturellement présent dans la rhizosphère de ceps de vigne plantés dans différents sols de la région bordelaise (Gerbore et al., 2014b) a été utilisé. Ce microorganisme est connu pour son aptitude à protéger les plantes contre de nombreuses infections par les bioagresseurs (Benhamou et al., 2012 ; Gerbore et al., 2014a ; Rey et al., 2008), notamment l'oïdium et la pourriture grise chez la vigne (Gerbore et al. 2014b; Mohamed et al., 2007).

P. oligandrum a plusieurs modes d'action, il peut exercer un effet direct sur les champignons pathogènes en les mycoparasitant ou en produisant des antibiotiques, mais également un effet indirect en stimulant les systèmes de défense des végétaux qu'il colonise, ce qui leur permet de résister aux infections contre de nombreux agents pathogènes. La littérature indique que cette action indirecte constitue le principal moyen par lequel, *P. oligandrum*, exerce une protection sur le végétal (Benhamou et al., 2012 ; Gerbore et al., 2014a ; Rey et al., 1998). Plusieurs travaux ont montré que cette induction pouvait être recréée en appliquant des protéines élicitrices produites par *P. oligandrum*, *i.e.* l'oligandrine et les CWPs, sur le végétal (Takenaka et al., 2006 ; Mohamed et al., 2007 ; Takenaka et Tamagake, 2009 ; Gerbore et al., 2014b). La production d'oligandrine représente donc un critère intéressant pour sélectionner les souches de cet oomycète. Vallance et al. (2009) avait montré que d'autres espèces de *Pythium* produisaient des molécules de même poids

moléculaires, mais que cette protéine était spécifique à *P. oligandrum*. Dans notre étude, la concentration d'oligandrine a été déterminée par HPLC à partir des filtrats de culture de souches de *P. oligandrum*. Celles produisant des quantités importantes de cette molécule élicitrice ont été choisies afin de protéger des plants de vigne contre un agent pathogène pionnier de l'esca, *P. chlamydospora*. Les quantités d'oligandrine étaient comprises entre 61-100 mg/L, ce qui est égal ou supérieur à la valeur de 63 mg/l mesurée chez la première souche utilisée par Picard et al. (2000b) pour mettre en évidence et purifier cette protéine.

P. oligandrum est capable de protéger les plants contre les attaques de nombreux pathogènes en induisant une résistance locale, *i.e.* au niveau racinaire (Benhamou et al., 1997 ; Masunaka et al., 2009) mais également systémique (Le Floch et al. 2003b ; Mohamed et al. 2007). Cette propriété a été utilisée lors de cette thèse, et cette résistance, étendue à l'ensemble de la plante, a été étudiée en utilisant différentes approches, *i.e.* une série de 22 gènes de défense de la vigne, des approches globales d'analyse du transcriptome (microarray, RNAseq) et la microscopie confocale. Chacune a apporté des informations spécifiques et a permis de reconstituer un schéma global des mécanismes mis en place *in planta* par les différents acteurs de l'interaction tripartite, *P. oligandrum*, vigne, *P. chlamydospora*. La résistance systémique induite a d'abord été étudiée en utilisant un modèle simple, *i.e.* boutures pied-francs, puis un modèle plus complexe de plants de vigne greffés.

Pour que la protection associée à un agent de biocontrôle soit efficace, celui-ci doit s'implanter et persister sur le végétal sur lequel il a été appliqué. Pour cela, la colonisation de différentes souches de cet oomycète au niveau des racines des plants de vigne a été vérifiée dans toutes les expérimentations. Nos résultats ont montré qu'avec tous les inocula et les différents plants, pied-francs ou greffés, les différentes souches de l'oomycète colonisaient et persistaient sur les racines des plants de vigne tout au long de l'expérimentation (3 à 4 mois). Cette aptitude de *P. oligandrum* renforce l'intérêt de son utilisation en tant qu'agent de biocontrôle chez la vigne. Cet oomycète ne semble pas non plus induire de bouleversements notables chez les communautés microbiennes indigènes présentes dans la rhizosphère et la phyllosphère des jeunes plants de vigne. Néanmoins, afin de vérifier ces observations sur le moyen et long terme, des prélèvements réalisés 3 et 18 mois après inoculation par *P. oligandrum*, sont en cours d'analyse.

Les plants infectés par *P. chlamydospora* sont davantage colonisés par *P. oligandrum* au niveau de leur système racinaire que ceux inoculés par l'oomycète uniquement. Fait intéressant, ce résultat a été obtenu avec les deux modèles biologiques utilisés (boutures pied-francs et plants greffés). Cette tendance, observée pour les trois inocula de *P. oligandrum* lors des trois essais sous serre avec les pied-francs de Cabernet Sauvignon, s'accroît même à la fin de l'expérimentation (publication 2, Yacoub et al., 2016, page 92). En ce qui concerne les plants greffés (SO4+Cabernet Sauvignon), la même tendance a été mesurée, 3 et 4 mois après inoculation par l'oomycète, cependant ces différences n'étaient pas significatives. L'hypothèse que l'agent pathogène modifierait la physiologie de la plante et donc les exsudats racinaires de la plante ce qui, en retour, favoriserait la colonisation par *P. oligandrum* a alors été posée. En soutien à cette remarque, Jones et al. (2004) ont suggéré que la quantité et la composition des exsudats racinaires dépendent de plusieurs facteurs *e.g.* l'espèce et l'âge des plants ainsi que les facteurs externes abiotiques et biotiques, *P. chlamydospora* dans notre cas.

En comparant les taux d'implantation des différentes souches de *P. oligandrum* lors des 3 essais réalisés sous serre (*cf* partie I.1, page 96), les pourcentages de colonisation les plus élevés avaient été obtenus avec l'inoculum Po3. Ceci pourrait être attribué au fait que Po3 est composé de 2 souches isolées du vignoble (Gerbore et al., 2014b), alors que pour les 2 autres inocula, Po1 et Po2, au moins une souche provenait de la collection CBS. Ces résultats confirment l'hypothèse de Gerbore et al (2014b), indiquant que les souches isolées à partir des vignobles sont plus adaptées au système racinaire de la vigne, et présentent par conséquent des taux d'implantation plus élevés. Néanmoins, cette forte colonisation n'est pas corrélée au niveau de protection qui est équivalent dans les 3 essais (40% à 50%).

L'évaluation de l'effet protecteur de *P. oligandrum* sur des plants de vigne pied-francs a été réalisée par mesure des nécroses causées par l'agent pathogène, 4 mois après son inoculation au niveau de la tige (*cf* partie I.1 page 96). Cette méthode d'évaluation était pertinente et la taille de nécroses était significativement réduite (de 40 à 50%) chez les plants traités par *P. oligandrum* + *P. chlamydospora* par rapport à ceux infectés uniquement par l'agent pathogène. Cependant, cette méthode d'observation classiquement utilisée avec *P. chlamydospora* (Laveau et al., 2009 ; Pouzoulet et al., 2013) n'est pas adaptée au modèle des plants greffés, car les témoins développent naturellement des nécroses au point de greffe. Malgré cette limite, la même tendance à la réduction du développement des nécroses a été montrée pour la première fois chez des plants greffés. La quantification de l'ADN de *P. chlamydospora* par PCR_q confirme ce résultat, mais uniquement dans le porte-greffe, les

différences observées ne sont toutefois pas statistiquement significatives. Afin de mettre valider et consolider cet essai préliminaire, de futures expérimentations devront être réalisées avec des greffons qui ont des tailles plus importantes, plusieurs cépages pourront aussi être utilisés.

Afin d'établir un lien entre la protection observée et les mécanismes de défenses exprimés chez la plante, ceux-ci ont été étudiés, à des temps relativement précoces 0 et 14 jpi (soit 2h et 14 jours) après l'infection par le pathogène. Dans un premier temps, 22 gènes impliqués dans les différentes voies de défense de la vigne ont été ciblés (Dufour et al., 2013). Le principal intérêt de ces 22 gènes est qu'ils ont été déjà utilisés avec succès pour déterminer les réponses de *V. vinifera* prétraitée par le benzothiadiazole (un stimulateur des défenses de la plante analogue de l'acide salicylique) contre l'oïdium et le mildiou (Dufour et al., 2013) et que leur dosage est rapide et fiable.

Pour les essais réalisés sur des boutures de Cabernet Sauvignon avec les 3 inocula, les réponses spécifiques de la vigne sont significativement différentes selon les traitements : témoin percé, *P. oligandrum*, *P. chlamydospora* et *P. oligandrum* + *P. chlamydospora*. Six gènes associés à l'infection par *P. chlamydospora* sont plus induits lorsque les plants sont pré-inoculés par *P. oligandrum*. Trois gènes appartiennent à la famille des protéines PR (*Pr10*, *Glu* et *Chit3*) et trois autres (*Gst*, *Lox* et *Pal*) sont impliqués respectivement dans le système d'oxydo-réduction, la voie des oxylipines et celle des phénylpropanoïdes. Étant donné que les plants mettent en place plus rapidement et plus intensément leurs mécanismes de défense lorsqu'ils sont soumis à un stress, ici l'infection par *P. chlamydospora*, l'hypothèse que *P. oligandrum* potentialise les défenses de la vigne (selon la définition de Conrath (2009)) a alors été émise. Cette observation est en phase avec ce qui a été observé par de nombreux auteurs dont Benhamou et al. (1997), Picard et al. (2000b), Le Floch et al. (2003b), Takenaka et al. (2005). L'originalité de notre expérimentation tient au fait que les réponses de la plante sont globalement identiques pour les 3 inocula comprenant des souches différentes de *P. oligandrum*, chacune ayant au moins 2 gènes codant pour l'oligandrine et une CWP.

L'universalité de cette réponse de la vigne colonisée par *P. oligandrum* demande encore à être démontrée mais elle est plausible au regard des résultats obtenus. Un point d'achoppement pourrait cependant s'avérer être les tissus utilisés, les feuilles dans l'étude de Dufour et al. (2013) et la tige dans notre cas. Aussi, afin d'approfondir nos connaissances sur cette triple interaction, mais aussi d'obtenir des réponses géniques qui lui sont spécifiques,

une analyse transcriptomique globale de la plante a été réalisée par microarray *V. vinifera* (29 549 gènes) pour les plants pied-francs au niveau de la tige et des feuilles pour les greffés.

Au niveau du bois de la tige, le traitement des plants pied-francs de vigne par *P. oligandrum* seul n'a induit que très peu de modifications transcriptionnelles (189 gènes différentiellement exprimés), tandis que les plants pré-traités par *P. oligandrum* puis infectés par *P. chlamydospora* montrent une expression différentielle pour 1858 gènes. Ce résultat n'a pas été vérifié au niveau foliaire pour les plants greffés. En effet, en réponse à la colonisation par *P. oligandrum*, 159 gènes sont différentiellement exprimés et 14 gènes seulement, dans le cas *P. oligandrum* + *P. chlamydospora*. Ces différences peuvent certainement être attribuées aux deux modèles biologiques utilisés. Parmi les raisons qui pourraient expliquer cette faible réponse au niveau foliaire des plants greffés, on peut citer : le perçage de la tige associé à l'inoculation de l'agent pathogène au niveau de greffons ayant une petite taille (2 à 3 cm). Ce double effet induit un fort état de stress pour les plantes qui s'est maintenu entre 0 et 14 jpi. Par conséquent, les réponses de la plante spécifique à l'inoculation par *P. oligandrum* et/ou *P. chlamydospra* ne montraient pas de différences entre 0 et 14 jpi.

Point intéressant, et qui vient en appui à l'hypothèse énoncée ci-avant, un résultat similaire a été observé au niveau du tronc pour les plants pied-francs, et au niveau foliaire pour les plants greffés, chez les plants témoins non percés (et non infectés) colonisés par *P. oligandrum* au niveau des racines. Il s'agissait d'une induction significative des facteurs de transcriptions de la famille Apetala2 EREBP impliqués dans la régulation des voies de signalisation de l'éthylène et de l'acide jasmonique (Pré et al., 2008; Lorenzo et al., 2003; Memelink 2009 ; Pieterse et al., 2014). Ces résultats sont aussi cohérents avec les travaux de Hase et al. (2006, 2008) qui rapportent que l'inoculation des plants par *P. oligandrum* active les voies de signalisation de l'éthylène et de l'acide jasmonique.

Dans la présente étude, l'analyse par microarray, au niveau du bois, montre également que certains gènes, en relation avec l'ISR, étant plus exprimés lorsque les plants pied-francs sont traités par *P. oligandrum* puis *P. chlamydospora* : l'ACC synthase, Allene oxyde synthase, 1 gène de la famille bHLH et 3 gènes de la famille AP2/ERBF). Ces gènes sont potentiellement intéressants dans le processus d'induction de résistance car une surexpression du gène ORA59 appartenant à la famille AP2/ERBF confère une résistance aux plants d'*Arabidopsis* contre l'attaque de *B. cinerea*. Un suivi de l'expression de ces gènes au cours

du temps permettra certainement de mieux comprendre leurs rôles dans la protection observée dans la présente interaction.

Les différents résultats obtenus avec les deux méthodes moléculaires utilisées, PCRq et microarrays, ont montré des différences en termes de gènes induits et de temps. Par PCRq, l'expression de 6 gènes est augmentée (3 protéines PR et *Pal*, *Gst* et *Lox*) chez les plants pré-traités par l'oomycète et infectés par *P. chlamydospora* à 14 jpi. Avec les microarrays, les gènes les plus différentiellement exprimés sont à 0 jpi et ce sont ceux impliqués dans les voies de signalisation de l'éthylène et des jasmonates. Ces différences pourraient être dues au fait que les gènes sélectionnés par microarrays sont davantage spécifiques à la vigne et donc à cette réaction tripartite. Néanmoins, les deux approches se complètent et ont montré que *P. oligandrum* potentialise les défenses des plants de vigne contre l'attaque par *P. chlamydospora*.

La plupart des études scientifiques sur les interactions tripartites (agent de biocontrôle, hôte et pathogène), qui aboutissent à une protection de la plante *via* la stimulation de ses défenses, se focalisent sur les réponses transcriptomiques de la plante. Dans notre étude, en plus des réponses du végétal, les analyses RNAseq ont permis d'évaluer l'effet indirect de *P. oligandrum* sur les réponses transcriptomiques de l'agent pathogène *P. chlamydospora*. La difficulté de cette analyse consistait à récupérer les séquences transcriptomiques du pathogène à partir des échantillons du bois, vue la faible quantité des ARN du champignon par rapport à celles de la plante. Afin d'optimiser cette analyse, l'utilisation d'un kit Ribo-zero potentiellement adaptée pour augmenter la quantité relative des populations d'ARNm en diminuant la population des ARN ribosomique dans l'échantillon séquencé, a permis de détecter 2347 transcrits différents sur les 7279 gènes du génome de *P. chlamydospora* (Antonnielli et al., 2014 ; Morales-Cruz et al., 2014). Parmi les 2347 transcrits collectés dans nos échantillons, 463 sont détectés seulement dans les échantillons issus des plants traités par l'agent pathogène. Le nombre de transcrits récupérés uniquement dans les échantillons de bois issus des plants traités par les deux microorganismes s'élève à 754 transcrits. Par conséquent, la présence de *P. oligandrum* au niveau racinaire affecte indirectement les réponses transcriptomiques du pathogène. Une analyse plus fine de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des métabolites secondaires et de leurs régulations, des CAZymes et des différentes voies de protéines kinases ont montré que la présence de l'oomycète se traduit par un stress sur le pathogène. La colonisation des racines par *P. oligandrum* inhibe ou induit l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des

enzymes qui interviennent dans la synthèse des toxines *e.g* les NRPS sont plutôt inhibées alors que les t1PKs sont plus induits. Cette modification de production de toxines pourrait être un signal indiquant que le pathogène est en état de stress. Ce phénomène se manifeste aussi par une expression plus élevée de certains gènes impliqués dans la réponse au stress (Ish1) et des protéines kinases (la famille Wsc et Swi6). A l'inverse, l'expression de certains gènes impliqués dans la croissance invasive (McmA, Ste7, Ste20 et Sho1) est fortement réduite. La réduction de l'expression de ces gènes pourrait expliquer, en association avec d'autres facteurs, la réduction de nécroses causée par *P. chlamydospora*, observée à la fin de l'expérimentation chez les plants inoculés par *P. oligandrum*. Les études transcriptomiques réalisées ont donc apportées des informations nouvelles sur les réponses de l'hôte et de *P. chlamydospora* en fonction des traitements microbiens appliqués sur le végétal. Afin de visualiser certaines réactions de défenses chez l'hôte, les tissus des plants ont été observés par microscopie confocale à balayage laser (MCBL). La formation de tyloses et des composés fluorescents comme les phénols ont principalement été mis en évidence. Les plus faibles réponses étaient observées chez les plants colonisés uniquement par *P. oligandrum*, ce qui est en adéquation avec les résultats précédents et les travaux utilisant ce microorganisme sur d'autres plantes (Le Floch et al., 2003b et 2009 ; Picard et al. 2000b). Une diminution de la formation des tyloses et de l'émission de composés fluorescents dans le bleu, est également notée chez les plants inoculés par les deux microorganismes par rapport à ceux infectés par *P. chlamydospora* uniquement. Cependant ces tendances n'étaient pas statistiquement significatives et elles devront donc être confirmées ultérieurement. Afin d'améliorer ces premières observations, des prélèvements à des temps plus longs devront être réalisés, Pierron (2015) rapportait en effet que *P. chlamydospora* colonise les vaisseaux de xylème 12 semaines après son inoculation.

En conclusion, les travaux de cette thèse ont montré que *P. oligandrum* protège les plants de vigne contre l'attaque de *P. chlamydospora* en potentialisant l'expression de certains gènes impliqués dans les voies de signalisation de l'éthylène et du jasmonate. De plus, la colonisation racinaire des plants par *P. oligandrum* induit indirectement un stress sur le pathogène, comme l'indiquent les réponses transcriptomiques observées au niveau du tronc. La capacité de l'oomycète à coloniser le système racinaire de différents porte-greffes a été démontrée. Cette colonisation n'induit pas de perturbation sur la microflore colonisant naturellement les racines et les feuilles des plants de vigne.

A partir des résultats de nos travaux, plusieurs pistes d'études et d'applications sont envisageables :

- **Déterminer des marqueurs génétiques de la résistance chez la vigne contre *P. chlamydospora***

Les analyses transcriptomiques par microarray de la résistance induite par *P. oligandrum* chez la vigne vont permettre de mettre en évidence des gènes marqueurs de cette résistance contre *P. chlamydospora*. Les gènes impliqués dans les voies de l'éthylène et du jasmonate seront utiles pour caractériser cette interaction tripartite à des temps précoces chez les plants pied-francs. Les prochaines analyses consisteront à valider ces gènes.

Pour ce qui concerne les plants greffés, des essais utilisant des greffons de tailles plus grandes devront être réalisés afin de diminuer le stress induit par le perçage. Ces essais permettront de développer des marqueurs foliaires de protection (méthode non destructive du plant).

L'effet indirect de *P. oligandrum* sur *P. chlamydospora* a été démontré. Des gènes du pathogène pourraient aussi être ciblés comme marqueur de stress du pathogène (production de toxines, CAZymes, etc.).

- **Etude de l'effet de *P. oligandrum* sur la physiologie de la plante**

Afin de renforcer l'intérêt de l'utilisation de *P. oligandrum* chez la vigne, il est important d'étudier son effet sur la physiologie de cette plante : photosynthèse, évapotranspiration, transport d'assimilats, etc. La vigne étant une plante essentiellement cultivée pour faire du vin, il serait judicieux de déterminer quel est l'effet de *P. oligandrum* sur la qualité des baies et par conséquent sur celle du vin.

- **Effet de *P. chlamydospora* sur les exsudats racinaires de la vigne**

Nos résultats ont montré que l'infection par *P. chlamydospora* est associée à une colonisation plus élevée par *P. oligandrum* au niveau racinaire. Des expérimentations seront réalisées d'abord, pour confirmer cette tendance. Ensuite, il serait intéressant d'étudier l'effet de *P. chlamydospora* sur les exsudats racinaire de la plante au cours de temps, pour connaître quel est le facteur qu'il est nécessaire de stimuler pour augmenter la colonisation des racines par l'oomycète.

- **Etude des réponses transcriptomiques de *P. oligandrum* au niveau des racines de la vigne**

A la fin de cette période de travaux de thèse (octobre 2015), le génome de *P. oligandrum* (Po37) a été séquencé (Berger et al., 2016). Les résultats préliminaires montrent que la taille de génome est d'environ 36 939 688 pb et environ 11 695 protéines ont prédites. Les gènes codant pour les protéines elicitor-like (CWPs et l'oligandrine) ont été retrouvés. Des gènes connus chez des oomycètes, e.g. *Phytophthora* spp. (*P. sojae*, *P. parasitica*, *P. infestans*, *P. phaseoli*) et *Pythium* spp. (*P. ultimum*, *P. hydnosporum*, *P. periplocum*) non liés à la pathogénicité ont aussi été identifiés. Ces nouveaux éléments vont ouvrir plusieurs pistes pour l'utilisation de *P. oligandrum* en tant qu'agent de biocontrôle. Par exemple, les réponses transcriptomiques émises lors de la triple interaction, vigne, *P. chlamydospora* et *P. oligandrum*, ont été étudiées dans la présente thèse par RNAseq pour la plante et le pathogène. Elles pourront maintenant être complétées par celles de l'oomycète au niveau des racines. Elles apporteront de nouvelles informations sur le niveau d'expression des gènes codant pour les molécules élicitrices sous différentes conditions, mais aussi d'autres gènes comme ceux impliqués dans la synthèse d'auxines et autres molécules d'intérêt.

- **Evaluer la persistance de *P. oligandrum* dans les vignobles**

Après avoir vérifié que *P. oligandrum* est capable de coloniser et persister sur les racines de différents porte-greffes en serre. La prochaine étape consistera à inoculer cet oomycète au vignoble et à vérifier son aptitude à persister sur les ceps dans les conditions environnementales réelles. Le récent séquençage du génome complet de *P. oligandrum* (Po37) permettra de développer des marqueurs spécifiques de cette souche. Cette étape est importante car *P. oligandrum* colonisent naturellement les racines de vigne (Gerbore et al., 2014b) et la souche Po37 pourra ainsi être suivie dans l'environnement microbien complexe de la rhizosphère. L'effet de l'oomycète sur la microflore indigène de la vigne sera étudié par empreintes moléculaires et méthode cultivable à haut débit. Il serait intéressant aussi d'étudier l'effet de *P. oligandrum* sur les communautés fonctionnelles en choisissant des paramètres à suivre en relation avec la qualité du sol, comme l'analyse des activités nitrifiantes et des activités enzymatiques microbiennes (β -glucosidase, phosphatase, etc.).

- **Biotisation des plants**

Afin d'améliorer les niveaux de protection par un agent de biocontrôle, une stratégie consiste à combiner plusieurs micro-organismes ayant des modes d'action différents. En pépinière et afin de produire de plants de meilleure qualité, *P. oligandrum* pourrait être introduit dans le processus de biotisation des plants. Des essais sont en cours à l'UMR SAVE, où des bactéries antagonistes sont inoculées au niveau de la tige et *P. oligandrum* sur les racines.

En somme, *P. oligandrum* est un agent ayant de nombreuses propriétés intéressantes, certaines semblent même uniques au vue de la littérature scientifique actuelle, et nous pensons que l'ensemble des résultats obtenus et les actions proposées participeront à l'établissement de nouvelles perspectives pour développer le biocontrôle à l'aide d'agents microbiens.

Références bibliographiques

- Abdalla, M.A., Win, H.Y., Islam, M.T., von Tiedemann, A., Schuffler, A., Laatsch, H., 2011. Khatmiamycin, a motility inhibitor and zoosporicide against the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola* from *Streptomyces* sp. ANK313. *J. Antibiot.* 64, 655-659.
- Abou-Mansour, E., Couche, E., Tabacchi, R., 2004. Do fungal naphthalenones have a role in the development of esca symptoms? *Phytopathol. Mediterr.* 43, 75-82.
- Abou-Mansour, E., Débieux, J.-L., Ramirez-Suero, M., Bénard-Gellon, M., Magnin-Robert, M., Spagnolo, A., Chong, J., Farine, S., Bertsch, C., L'Haridon, F., Serrano, M., Fontaine, F., Rego, C., Larignon, P., 2015. Phytotoxic metabolites from *Neofusicoccum parvum*, a pathogen of Botryosphaeria dieback of grapevine. *Phytochemistry* 115, 207-215.
- Ahn, I.P., Kim, S., Lee, Y.H., Suh, S.C., 2007. Vitamin B1-induced priming is dependent on hydrogen peroxide and the *NPR1* gene in *Arabidopsis*. *Plant. Physiol.* 143, 838-848.
- Albertazzi, G., Milc, J., Caffagni, A., Francia, E., Roncaglia, E., Ferrari, F., Tagliafico, E., Stefani, E., Pecchioni, N., 2009. Gene expression in grapevine cultivars in response to Bois Noir phytoplasma infection. *Plant. Science.* 176, 792-804.
- Alizadeh, H., Behboudi, K., Ahmadzadeh, M., Javan-Nikkhah, M., Zamioudis, C., Pieterse, C.M.J., Bakker, P.A.H.M., 2013. Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. *Biol. Control.* 65, 14-23.
- Alfonzo, A., Conigliaro, G., Torta, L., Burruano, S., Moschetti, G., 2009. Antagonism of *Bacillus subtilis* strain AG1 against vine wood fungal pathogens. *Phytopathol. Mediterr.* 48, 155-158.
- Andolfi, L., Mugnai, L., Luque, J., Surico, G., Cimmino, A., Evidente, A., 2011. Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. *Toxins* 3, 1569–1605.
- Antonielli, L., Compant, S., Strauss, J., Sessitsch, A., Berger, H., 2014. Draft Genome Sequence of *Phaeomoniella chlamydospora* Strain RR-HG1, a Grapevine Trunk Disease (Esca)-Related Member of the Ascomycota. *Genome announcements* 2: 2013–2014.

- Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P., Höfte, M., 2002. Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 15, 1147-1156.
- 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*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 16, 1118-1128.
- Aziz, A., Heyraud, A., Lambert, B., 2004. Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta.* 218, 767-774.
- 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, 1188-1194.
- Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., Van Loon, L.C., 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology.* 97, 239 -243.
- Bari, R., Jones, J.D.G., 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant. Mol. Biol.* 69, 473-488.
- Bechinger, C., Giebel, K.F., Schnell, M., Leiderer, P., Deising, H.B., Bastmeyer, M., 1999. Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science.* 285, 1896-1899.
- Belle, A., 2012. Agressivité de *Botryosphaeriaceae* spp et défenses moléculaires de *vitis vinifera*. Mémoire de Master2 Recherche Biologie et Biotechnologie des plantes. Bordeaux.
- Belhadj, A., Telef, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S., Merillon, J.M., 2008. Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant. Physiol. Biochem.* 46, 493-499.
- Bellow, S., 2012. Étude des composés phénoliques impliqués dans la réponse des feuilles de vigne au Mildiou (Thesis). Université de Paris Sud university, France.

- Benhamou, N., Rey, P., Cherif, M., Hockenhull, J., Tirilly, Y., 1997. Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defense-related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathol.* 87, 108-122.
- Benhamou, N., Rey, P., Picard, K., Tirilly, Y., 1999. Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and soilborne plant pathogens. *Phytopathol.* 89, 506-517.
- Benhamou, N., Garand, C., 2001. Cytological analysis of defense-related mechanisms induced in pea root tissues in response to colonization by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Phytopathol.* 91, 730-740.
- Benhamou, N., Belanger, R.R., Rey, P., Tirilly, Y., 2001. Oligandrin, the elicitor-like protein produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum*, induces systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato. *Plant. Physiol. Biochem.* 39, 681-696.
- Benhamou, N., le Floch, G., Vallance, J., Gerbore, J., Grizard, D., Rey, P., 2012. *Pythium oligandrum*: an example of opportunistic success. *Microbiol.* 158, 2679-2694.
- Berger, H., Yacoub, A., Gerbore, J., Grizard, D., Rey, P., Sessitsch, A. and Compant. S., 2016. Draft genome sequence of the biocontrol agent *Pythium oligandrum* Po37. *Genome Announcement*.
- Bernard, A.C., 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.* 103, 288-289.
- Bertsch, C., Ramírez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E., Spagnolo, A., Clément, C., Fontaine, F., 2013. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant. Pathol.* 62, 243-265.
- Boller, T., Felix, G., 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 60, 379-406.

- Boudet, A.M., Lapierre, C., Grima-Pettenati, J., 1995. Biochemistry and molecular biology of lignification. *New. Phytol.* 129, 203–236.
- Bouizgarne, B., El-Maarouf-Bouteau, H., Frankart, C., Rebutier, D., Madiona, K., Pennarun, A.M., Monestiez, M., Trouverie, J., Amiar, Z., Briand, J., Brault, M., Rona, J.P., Ouhdouch, Y., El Hadramiand, I., Bouteau, F., 2006. Early physiological responses of *Arabidopsis thaliana* cells to fusaric acid: toxic and signalling effects. *New. Phytol.* 169, 209–218.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P., Lamb, C.J., 1992. Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a plant cell wall proline-rich protein: a novel, rapid defense response. *Cell.* 70, 21-30.
- Bradshaw-Smith, R.P., Whalley, W.M., Craig, G.D., 1991. Interactions between *Pythium oligandrum* and the fungal foot rot pathogens of peas. *Mycol. Res.* 95, 861–886.
- Brotman, Y., andau, L., Cuadros-Inostroza, A., Takayuki, T., Fernie, A.R., Chet, I., Viterbo, A., Willmitzer, L., 2013. *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS. Pathog.* 9, e1003221.
- Bruetz, E., 2013. Etude comparative des communautés fongiques et bactériennes colonisant le bois de ceps de vigne ayant exprimé ou non des symptômes d'esca (Thesis). Université de Bordeaux 2, France.
- Bruetz, E., Lecomte, P., Grosman, J., Doublet, B., Bertsch, C., Fontaine, F., Ugaglia, A., Teisseidre, P.L., Guerin-Dubrana, L., Rey, P., 2013. Overview of the grapevine trunk diseases in France in the early 2000s. *Phytopathol. Mediterr.* 52, 262-275.
- Bruetz, E., Vallance, J., Gerbore, J., Lecomte, P., Da Costa, J.P., Guerin-Dubrana, L., Rey, P., 2014. Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of esca leaf-symptomatic and asymptomatic vines. *PLoS One*9:e95928.
- Bruetz, E., Haidar, R., Alou, M.T., Vallance, J., Bertsch, C., Mazet, F., Fermaud, M., Deschamps, A., Guerin-Dubrana, L., Compant, S., Rey, P., 2015. Bacteria in a wood fungal disease: characterization of bacterial communities in wood tissues of esca-foliar symptomatic and asymptomatic grapevines. *Front. Microbio.* 6, 1137.

- Bruno, G., Sparapano, L., 2006. 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. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 69, 182-194.
- 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. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 71, 106-124.
- Busam, G., Junghanns, K.T., Kneusel, R.E., Kassemeyer, H.H., Matern, U., 1997. Characterization and expression of caffeoyl-coenzyme a 3-O-methyltransferase proposed for the induced resistance response of *Vitis vinifera* L. *Plant. Physiol.* 115, 1039-1048.
- Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169–193.
- Calonnec, A., Cartolaro, P., Poupot, C., Dubourdieu, D., Darriet, P., 2004. Effects of *Uncinula necator* on the yield and quality of grapes (*Vitis vinifera*) and wine. *Plant. Pathol.* 53, 434-445.
- Calonnec, A., Cartolaro, P., Naulin, J.M., Bailey, D., Langlais, M., 2008. A host-pathogen simulation model: powdery mildew of grapevine. *Plant. Pathol.* 57, 493-508.
- 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*. *J. exp. bot.* 61, 1719-1737.
- Carisse, O., Bacon, R., Lefebvre, A., Lessard, K., 2009. A degree-day model to initiate fungicide spray programs for management of grape powdery mildew (*Erysiphe necator*). *Canadian J. Plant. Pathol.* 31, 186-194.
- Casieri, L., Hofstetter, V., Viret, O., Gindro, K., 2009. Fungal communities living in the wood of different cultivars of young *Vitis vinifera* plants. *Phytopathol. Mediterr.* 48, 73-83.
- Chen, S., Morgan, D.P., Hasey, J.K., Anderson, K., Michailides, T.J., 2014. Phylogeny, morphology, distribution and pathogenicity of Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae from English Walnut in California. *Plant. Dis.* 98, 636-652.

- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., Staskawicz, B.J., 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*. 124, 803-814.
- Comont, G., Corio-Costet, M.F., Larignon, P., Delmotte, F., 2010. AFLP markers reveal two genetic groups in the French population of the grapevine fungal pathogen. *Eur. J. Plant. Pathol.* 127, 451-464.
- Compant, S., Mathieu, F., 2011. Biocontrol des maladies de la vigne avec des microbes bénéfiques. Une alternative à la chimie de synthèse en viticulture. *Rev. Oenol.* 141, 25.
- Compant, S., Brader, G., Muzammil, S., Sessitsch, A., Lebrihi, A., Mathieu, F., 2013. Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. *BioControl.* 58, 435-455.
- Conrath, U., Pieterse, C.M.J., Mauch-Mani, B., 2002. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends. Plant. Sci.* 7, 210-216.
- Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V., Garcia Agustin, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M.A., Pieterse, C.M.J., Poinssot, B., Pozo, M.J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L., Mauch-Mani, B., 2006. Priming: getting ready for battle. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 19, 1062-1071.
- Cortesi, P., Milgroom, M.G., 2001. Outcrossing and diversity of vegetative compatibility types in populations of *Eutypa lata* from grapevines. *Australas. Plant. Pathol.* 83, 79-86.
- Cother, E.J., Gilbert, R.L., 1993. Comparative pathogenicity of *Pythium* species associated with poor seedling establishment of rice in Southern Australia. *Plant. Pathol.* 42, 151-157.
- Creaser, M.L., Wicks, T.J., 2000. Eutypa dieback - current status and future directions. *The Australian Grapegrower and Winemaker. Ann. Tech. Issue.* 438a, 82-87.
- Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W.F.O., Phillips, A.J.L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., Groenewald, J.Z., 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Stud. Mycol.* 55, 235-253.
- Dai, G.H., Andary, C., Mondolotcosson, L., Boubals, D., 1995. Involvement of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara viticola*). *Eur. J. Plant. Pathol.* 101, 541-547.

- Damiani, I., Baldacci-Cresp, F., Hopkins, J., Andrio, E., Balzergue, S., Lecomte, P., Puppo, A., Abad, P., Favery, B., Hérouart, D., 2012. Plant genes involved in harbouring symbiotic rhizobia or pathogenic nematodes. *New Phytol.* 194, 511-522.
- Dangl, J.L., Dietrich, R.A., Richberg, M.H., 1996. Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell.* 8, 1793 - 1807.
- Dangl, J.L., Jones, J.D.G., 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature.* 411, 826-833.
- De Meyer, G., Audenaert, K., Höfte, M., 1999a. *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-induced systemic resistance in tobacco depends on *in planta* salicylic acid accumulation but is not associated with PR1a gene-expression. *Eur. J. Plant. Pathol.* 105, 513-517.
- De Meyer, G., Capieau, K., Audenaert, K., Buchala, A., Métraux, J.P., Höfte, M., 1999b. Nanogram amounts of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 450-458.
- Delaney, T.P., Friedrich, L., Kessmann, H., Uknes, S., Vernooij, B., Ward, E., Weymann, K., Ryals, J., 1994. The molecular biology of systemic acquired resistance. In: Daniels, M., (Eds.), *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, volume 3. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 339-347.
- Delaunoy, B., Colby, T., Belloy, N., Conreux, A., Harzen, A., Baillieul, F., Clément, C., Schmidt, J., Jeandet, P., Cordelier, S., 2013. Large-scale proteomic analysis of the grapevine leaf apoplastic fluid reveals mainly stress-related proteins and cell wall modifying enzymes. *BMC. Plant. Biol.* 13, 24.
- Delière, L., Miclot, A.S., Rey, P., Calonnec, A., 2010. Efficacy of fungicides with various modes of action in controlling the early stages of an *Erysiphe necator*-induced epidemic. *Pest. Manag. Sci.* 66, 1367-1373.
- Delière, L., Cartolaro, P., Léger, B., Naud, O., 2015. Field evaluation of an expertise-based formal decision system for fungicide management of grapevine downy and powdery mildews. *Pest. Manag. Sci.* 71, 1247-1257.

- Denman, S., Crous, P.W., Taylor, J.E., Kang, J.C., Pascoe, I., Wingfield, M.J., 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Stud. Mycol.* 45, 129-140.
- 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 β -1, 3-glucanases of ripening grape berries. *Physiol. Plant.* 104, 56-64.
- Desprez-Loustau, M.L., Marcais, B., Nageleisen, L.M., Piou, D., Vannini, A., 2006. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Ann. For. Sci.* 63, 597-612.
- Deswarte, C., Rouquier, P., Roustan, J.P., Dargent, R., fallot, J., 1994. Ultrastructural changes produced in plantlet leaves and protoplasts of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon by eutypine, a toxin from *Eutypa lata*. *Vitis.* 33, 185-188.
- 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. *Eur. J. Plant. Pathol.* 124, 303-308.
- Dodd, A.N., Kudla, J., Sanders, D., 2010. The language of calcium signaling. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 61, 593-620.
- Dufour, M.C., Lambert, C., Bouscaut, J., Mérillon, J.M., Corio-Costet, M.F., 2013. Benzothiadiazole-primed defence responses and enhanced differential expression of defence genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*. *Plant. Pathol.* 62, 370-382.
- Duthie, J.A., Munkvold, G.P., Marois, J.J., Grant, S., Chellemi, D.O., 1991. Relationship between age of vineyard and incidence of *Eutypa dieback*. *Phytopathology.* 81, 1183.
- Edwards, J., Constable, F., Wiechel, T., Salib, S., 2007a. Comparison of the molecular tests – single PCR, nested PCR and quantitative PCR (SYBR Green and TaqMan) – for detection of *Phaeoemoniella chlamydospora* during grapevine nursery propagation. *Phytopathol. Mediterr.* 46, 58-72.

- Edwards, J., Salib, S., Thomson, F., Pascoe, I.G., 2007b. The impact of *Phaeoacremonium chlamydospora* infection on the grapevine's physiological response to water stress – part 1: Zinfandel. *Phytopathol. Mediterr.* 46, 26-37.
- Eskalen, A., Gubler, W.D., 2001. Association of spores of *Phaeoacremonium chlamydospora*, *Phaeoacremonium inflatipes*, and *Pm. aleophilum* with grapevine cordons in California. *Phytopathologia Mediterranea*. 40, Supplement, S429–S432.
- 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. *J. Plant. Physiol.* 166, 1863-1877.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., Boller, T., 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant. J.* 18, 265-276.
- Ferreira, J.H.S., Mathee, F.N., Thomas, A.C., 1991. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonist strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*. 81, 283-287.
- Flor, H.H., 1956. The complementary genic systems in flax and flax rust. *Adv. Genet.* 8, 29-54.
- Forneck, A., Kleinmann, S., Blaich, R., Anvari, S.F., 2002. Histochemistry and anatomy of Phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) nodosities on young roots of grapevine (*Vitis vinifera*). *Vitis*. 41, 93-97.
- Fourie, P.H., Halleen, F., van der Vyver, J., Schreuder, W., 2001. Effect of *Trichoderma* treatments on the occurrence of decline pathogens in the roots and rootstocks of nursery grapevines. *Phytopathol. Mediterr.* 40, 473–478.
- Fourie, P.H., Halleen, F., 2004. Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material. *Plant. Dis.* 88, 1241-1245.
- Fourie, P.H., Halleen, F., 2006. Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. *Eur. J. Plant. Pathol.* 116, 255-265.
- Fung, R.W., Gonzalo, M., Fekete, C., Kovacs, L.G., He, Y., Marsh, E., McIntyre, L.M., Schachtman, D.P., Qiu, W., 2008. Powdery mildew induces defense-oriented

- reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine. *Plant. Physiol.* 146, 236-249.
- Fussler, L., Kobes, N., Bertrand, F., Mauray, M., Grosman, J., Savary, S., 2008. A characterization of grapevine trunk diseases in France from data generated by the National GrapevineWood Diseases Survey. *Phytopathology.* 98, 571–579.
- Galet, P., 1999. Précis de pathologie viticole. 3ème édition, pp.7-1.
- Galet, P., 2000. Dictionnaire Encyclopédique des Cépages. In *Pratique H* (Eds.).
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., Pugin, A., 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant Defenses. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 19, 711-724.
- Gary, C., Brisson, N., Gaudillere, J.P., Duarte, M., 2003. Modélisation d'une espèce ligneuse pérenne à fruits charnus: la Vigne. Séminaire STICS, Arles: 36-37.
- Gerber, I.B., Dubery, I.A., 2004. Protein phosphorylation in *Nicotiana tabacum* cells in response to perception of lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Phytochem.* 65, 2957- 2966.
- Gerbore, J., 2013. Lutte biologique contre un champignon pathogène impliqué dans l'esca de la vigne par utilisation de l'oomycète *Pythium oligandrum* (Thesis). Université de Pau, France.
- Gerbore, J., Vallance, J., Yacoub, A., Delmotte, F., Grizard, D., Regnault-Roger, C., Rey, P., 2014b. Characterization of *Pythium oligandrum* populations that colonise the rhizosphere of vines from the Bordeaux region. *FEMS. microbiology. ecology.* 90, 153-167.
- Gerbore, J., Benhamou, N., Vallance, J., Le Floch, G., Grizard, D., Regnault-Roger, C., Rey, P., 2014. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 4847-4860.
- Gimenez-Jaime, A., Aroca, A., Raposo, R., Garcia-Jimenez, J., Armengol, J., 2006. Occurrence of fungal pathogens associated with grapevine nurseries and the decline of young vines in Spain. *J. Phytopath.* 154, 598-602.

- Godfrey, S.A.C., Monds, R.D., Lash, D.T., Marshall, J.W., 2003. Identification of *Pythium oligandrum* using species-specific ITS rDNA PCR oligonucleotides. *Mycol. Res.* 107, 790-796.
- Gohre, V., Robatzek, S., 2008. Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46, 189-215.
- Graham, L.S., Sticklen, M.B., 1994. Plant chitinases. *Can. J. Bot.* 72, 1057-1083.
- Gramaje, D., Armengol, J., 2011. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant. Dis.* 95, 1040-1055.
- Grosman, J., Doublet, B., 2012. Maladies du bois de la vigne. Synthèse des dispositifs d'observation au vignoble, de l'observatoire 2003–2008 au réseau d'épidémiologie-surveillance actuel. *Phytoma.* 651, 31-35.
- Gubler, W.D., Baumgartner, K., Browne, G.T., Eskalen, A., Rooney-Latham, S., Petit, E., Bayramian, L.A., 2004. Roots diseases of grapevine in California and their control. *Australas. Plant. Patho.* 33, 157-165.
- Guérin-Dubrana, L., Destrac-Irvine, A., Goutouly, J.P., Letouze, A., Gaudillère, J.P., 2005. Relationship between incidence of Esca and Black Dead Arm foliar symptom expression in the vineyard, ecophysiological indicators and cultural practices. *4th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases*, 20-21, Janvier 2005, South Africa.
- Guérin-Dubrana, L., Labrousse, J.C., Bastien, S., Rey, P., Gegout-Petit, A., 2013. Statistical analysis of grapevine mortality associated with Esca or *Eutypa* dieback foliar expression. *Phytopathol. Mediterr.* 52, 276–288.
- Guo, H.W., Ecker, J.R., 2004. The ethylene signaling pathway: New insights. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 7, 40-49.
- Haidar, R., Deschamps, A., Roudet, J., Calvo-Garrido, C., Bruez, E., Rey, P., Fermaud, M., 2016. Multi-organ screening of efficient bacterial control agents against two major pathogens of grapevine. *Biol. Control.* 92, 55-65.

- Halleen, F., Mostert, L., Crous, P.W., 2007. Pathogenicity testing of lesser-known vascular fungi of grapevines. *Australas. Plant. Pathol.* 36, 277-285.
- Hamiduzzaman, M.M., Jakab, G., Barnavon, L., Neuhaus, J.M., Mauch-Mani, B., 2005. β -aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 18, 819-829.
- Hase, S., Shimizu, A., Nakaho, K., Takenaka, S., Takahashi, H., 2006. Induction of transient ethylene and reduction in severity of tomato bacterial wilt by *Pythium oligandrum*. *Plant. Pathol.* 55, 537-543.
- Hase, S., Takahashi, S., Takenaka, S., Nakaho, K., Arie, T., Seo, S., Ohashi, Y., Takahashi, H., 2008. Involvement of jasmonic acid signalling in bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. *Plant. Pathol.* 57, 870-876.
- Héliot, L., 2006. Base de la microscopie confocale. Cours en ligne; http://www.picin.u-bordeaux2.fr/Cours/formation_2006/MicroscopieIIcours.pdf.
- Herlemont, B., Guerin-Dubrana, L., Larignon, P., 2005. L'après arsénite, des alternatives à combiner. Etat d'avancement des recherches sur les alternatives à l'arsénite de soude contre les maladies du bois de la vigne. *Phytoma.* 587, 24-28.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R., 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnol.* 10, 413-417.
- Hong, H., Pruden, A., Reardon, K.F., 2007. Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. *J. Microbiol. Methods.* 69, 52-64.
- Howe, G.A., Schillmiller, A.L., 2002. Oxylin metabolism in response to stress. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 5, 230-236.
- Hren, M., Nikolić, P., Rotter, A., Blejec, A., Terrier, N., Ravnkar, M., Dermastia, M., Gruden, K., 2009. 'Bois noir' phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC. Genomics.* 10, 460.

- Huckelhoven, R., 2007. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 101-127.
- Ikeda, S., Shimizu, A., Shimizu, M., Takahashi, H., Takenaka, S., 2012. Biocontrol of black scurf on potato by seed tuber treatment with *Pythium oligandrum*. *Biol. Control.* 60, 297-304.
- Ishiguro, T., Saitoh, J., Yawata, H., Yamagishi, H., Iwasaki, S., Mitoma, Y., 1995. Homogeneous qualitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater. *Anal. Biochem.* Anal.229, 207–213.
- Jaillon, O., Aury, J.M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin,C., et al. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature.* 449, 463-467.
- Jones, D., Hodge, A., Kuzyakov, Y., 2004. Plant and mycorrhizal regulation rhizodeposition. *New Phytol.* 163, 459–480.
- Jones, J.D.G., Dangl, J.L., 2006. The plant immune system. *Nature.* 444, 323-329.
- Ju, Y.M., Glawe, D.A., Rogers, J.D., 1991. Conidial germination in *Eutypa armeniacae* and selected other species of *Diatrypaceae*: Implications for the systematics and biology of Diatrypaceous fungi. *Mycotoxa.* 41, 311-320.
- Kachroo, P., Yoshioka, K., Shah, J., Hugo, K., Dooner, H.K., Klessig, D.F., 2000. Resistance to Turnip Crinkle Virus in Arabidopsis Is Regulated by Two Host Genes and Is Salicylic Acid Dependent but NPR1, Ethylene, and Jasmonate Independent. *Plant. Cell.* 12, 677-690.
- Kachroo, A., Kachroo, P., 2007. Salicylic acid-, jasmonic acid- and ethylene-mediated regulation of plant defense signaling. In: Setlow, J. (Eds), *Genetic Engineering, Principles and Methods.* Springer, Heidelberg, Germany. 28, 55-83.
- Kar Chun Tan, K.C., Ipcho, S.V.S., Trengove, R.D., Oliver, R.P., Solomon, P.S., 2009. Assessing the impact of transcriptomics, proteomics and metabolomics on fungal phytopathology. *Mol. Plant. Pathol.* 10, 703–715.

- Kawamura, Y., Takenaka, S., Hase, S., Kubota, M., Ichinose, Y., Kanayama, Y., Nakaho, K., Klessig, D.F., Takahashi, H., 2009. Enhanced defense responses in *Arabidopsis* induced by the cell wall protein fractions from *Pythium oligandrum* require *SGT1*, *RAR1*, *NPR1* and *JAR1*. *Plant. Cell. Physiology*. 50, 924–934.
- Knoester, M., Pieterse, C.M.J., Bol, J.F., Van Loon, L.C., 1999. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 12, 720-727.
- Kortekamp, A., Zyprian, E., 2003. Characterization of *Plasmopara*-resistance in grapevine using in vitro plants. *J. Plant. Physiol.* 160, 1393-1400.
- Kuc, J., 1995. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *An. Rev. Phytopathol.* 33, 275-297.
- Kuntzmann, P., Villaume, S., Bertsch, C., 2009. Conidia dispersal of *Diplodia* species in a French vineyard. *Phytopathol. Mediterr.* 48, 150–154.
- Kuntzmann, P., Barbe, J., Maumy-Bertrand, M., Bertrand, F., 2013. Late harvest as factor affecting esca and *Botryosphaeria dieback* prevalence of vineyards in the Alsace region of France. *Vitis*. 52, 197-204.
- Lamb, C., Dixon, R.A., 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant. Phy. Plant. Mol. Biol.* 48, 251-275.
- Lambert, C., 2011. Étude du rôle des stilbènes dans les défenses de la vigne contre les maladies du bois (Thesis). Université de Bordeaux 2, France.
- 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. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 19, 1103-1112.
- Lardner, R., 2003. Early diagnosis and detection of *Eutypa dieback* of grapevines (Thesis). University of Adelaide, Australia.

- Larignon, P., Fulchic, R., Cere, L., Dubos, B., 2001. Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathol. Mediterr.* 40, S336-S342.
- Larignon, P., Molot, B., 2004. Les maladies du bois expérimentations en cours et premiers résultats. *Progrès Agri et Viti* 21.
- Larignon, P., Fontaine, F., Farine, S., Clement, C., Bertsch, C., 2009. Esca and Black Dead Arm: two major actors of grapevine trunk diseases. *C. R. Acad. Sci. Biologie.* 332, 765-783.
- Larignon, P., 2012. Assessment of quality of plants in French grapevine nurseries with regard to fungi involved in wood diseases. In: ICGTD (International Council on Grapevine Trunk Disease) 8th International Workshop on Grapevine Trunk Disease. Valencia, Spain 18-21 June, 2012.
- 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. *Phytopathol. Mediterr.* 48, 32-46.
- Le Floch, G., Rey, P., Déniel, F., Benhamou, N., Picard, K., Tirilly, Y., 2003a. Enhancement of development and induction of resistance in tomato plants by the antagonist, *Pythium oligandrum*. *Agron.* 23, 455-460.
- Le Floch, G., Rey, P., Benizri, E., Benhamou, N., Tirilly, Y., 2003b. Impact of auxin-compounds produced by the antagonistic fungus *Pythium oligandrum* or the minor pathogen *Pythium* group F on plant growth. *Plant. Soil.* 257, 459-470.
- Le Floch, G., Benhamou, N., Mamaca, E., Salerno, M.I., Tirilly, Y., Rey, P., 2005. Characterisation of the early events in atypical tomato root colonisation by a biocontrol agent, *Pythium oligandrum*. *Plant. Physiol. Biochem.* 43, 1-11.
- Le Floch, G., Tambong, J., Vallance, J., Tirilly, Y., Levesque, A., Rey, P., 2007. Rhizosphere persistence of three *Pythium oligandrum* strains in tomato soilless culture assessed by DNA macroarray and real-time PCR. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 61, 317-326.

- Le Floch, G., Vallance, J., Benhamou, N., Rey, P., 2009. Combining the oomycete *Pythium oligandrum* with two other antagonistic fungi: root relationships and tomato grey mold biocontrol. *Biol. Control*. 50, 288-298.
- Le Henanff, G., 2009. Caractérisation fonctionnelle de gènes de signalisation intervenant dans les réponses de défense aux agents pathogènes chez la vigne (Thesis). Université de Haute- Alsace, France.
- 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, 405-417.
- Lecomte, P., Darrietort, G., Liminana, J.M., Comont, G., Muruamendiaraz, A., Legorburu, F.J., Choueiri, E., Jreijiri, F., El Amil, R., Fermaud, M., 2012. New insights into Esca of grapevine: The development of foliar symptoms and their association with xylem discoloration. *Plant. Dis.* 96, 924-934.
- Lehoczky, J., 1974. Black dead-arm disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 9, 319-327.
- Lievens, B., Brouwer, M., Vanachter, A.C.R.C., Cammue, B.P.A., Thomma, B.P.H.J., 2006. Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. *Plant. Sci.* 171, 155-165.
- Lima, M.R.M., Ferreres, F., Dias, A.C.P., 2012. Response of *Vitis vinifera* cell cultures to *Phaeoaniella chlamydospora*: changes in phenolic production, oxidative state and expression of defence-related genes. *Eur. J. Plant. Pathol.* 132, 133-146.
- Lorenzo, O., Piqueras ,R., Sánchez-Serrano, J.J., Solano, R. 2003. Ethylene response factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*, 15: 165–178.
- Lorrain, B., Ky, I., Pasquier, G., Jourdes, M., Dubrana, L.G., Rey, P., Teissedre, P.I., 2012. Effect of Esca disease on the phenolic and sensory attributes of Cabernet Sauvignon grapes, musts and wines. *Aust. J. Grape. Wine. Res.* 18, 64-72.

- 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. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 74, 403-411.
- Magnin-Robert, M., Trotel-Aziz, P., Quantinet, D., Biagiatti, S., Aziz, A., 2007. Biological control of *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated bacteria and stimulation of chitinase and β -1,3 glucanase activities under field conditions. *Eur. J. Plant. Pathol.* 118, 43-57.
- Maher, N., Piot, J., Bastien, S., Vallance, J., Rey, P., Guerin-Dubrana, L., 2012. Wood necrosis in esca-affected vines: types, relationships and possible links with foliar symptom expression. *J. Inter. Sci. Vigne. Vin.* 46, 15-27.
- Marchive, C., Léon, C., Kappel, C., Coutos-Thévenot, P., Corio-Costet, M.F., Delrot, S., Lauvergeat, V., 2013. Over-Expression of VvWRKY1 in Grapevines Induces Expression of Jasmonic Acid Pathway-Related Genes and Confers Higher Tolerance to the Downy Mildew. *PLoS One.* 8, 54185.
- Martin, F.N., Hancock, J.G., 1987. The Use of *Pythium oligandrum* for biological control of preemergence damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathol.* 77, 1013-1020.
- Martin, M.T., Cobos, R., Martin, L., López-Enriquez, L., 2012. Real-time PCR detection of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3985-3991.
- Martinez, C., Blanc, F., Le Claire, E., Besnard, O., Nicole, M., Baccou, J.C., 2001. Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat- denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Plant. Physiol.* 127, 334-344.
- 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*. *Eur. J. Plant. Pathol.* 121, 451-461.

- Masunaka, A., Nakaho, K., Sakai, M., Takahashi, H., Takenaka, S., 2009. Visualization of *Ralstonia solanacearum* cells during biocontrol of bacterial wilt disease in tomato with *Pythium oligandrum*. *J. Gen. Plant. Pathol.* 75, 281-287.
- Masunaka, A., Sekiguchi, H., Takahashi, H., Takenaka, S., 2010. Distribution and expression of elicitor-like protein genes of the biocontrol agent *Pythium oligandrum*. *J. Phytopathol.* 158, 417-426.
- Merchive, C., Roudier, F., Castaigns, L., Bréhaut, V., Blondet, E., Colot, V., Meyer, C., Krapp, A., 2013. Nuclear retention of the transcription factor NLP7 orchestrates the early response to nitrate in plants. *Nat. Commun.* 4, 1713.
- McQuilken, M.P., Whipps, J.M., Cooke, R.C., 1990. Control of damping-off in cress and sugar beet by commercial seed-coating with *Pythium oligandrum*. *Plant. Pathol.* 39, 452-462.
- Memelink, J., 2009. Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry.* 70, 1560–1570.
- Mishina, T.E., Zeier, J., 2006. The Arabidopsis flavin-dependent monooxygenase FMO1 is an essential component of biologically induced systemic acquired resistance. *Plant. Physiol.* 141, 1666-1675.
- Mohamed, N., Lherminier, J., Farmer, M.J., Fromentin, J., Beno, N., Houot, V., Milat, M.L., Blein, 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, 611-620.
- Moller, W.S., Kasimatis, A.N., 1978. Dieback of grapevines caused by *Eutypa armeniaca*. *Plant. Dis. Res.* 62, 254-258.
- Morales-Cruz, A., Amrine, K.C.H., Blanco-Ulate, B., Lawrence, D.P., Travadon, R., Rolshausen, P.E., Baumgartner, K., Cantu, D., 2015. Distinctive expansion of gene families associated with plant cell wall degradation, secondary metabolism, and nutrient uptake in the genomes of grapevine trunk pathogens. *BMC Genomics*, 16: 469.

- Morin, L., Paini, D.R., Randall, R.P., 2013. Can global weed assemblages be used to predict future weeds? PLoS ONE 8: e55547.
- Moyo, B., Ndlovu, S.L., Moyo, S.L., Masika, P.J., Muchenje, V., Ndhlovu, D.N., Maphosa, V., 2014. Alternative remedies and approaches by resources -challenged farmers in the management of cattle blackleg disease in Umzingwane district, Matabeleland South, Zimbabwe. Int. J. Livest. Prod. 6, 97-102.
- Mugnai, L., Graniti, A., Surico, G., 1999. Esca (black measles) and brown wood streaking: two old and Elusive diseases of grapevines. Plant. Dis. 83, 404-418.
- Nascimento, T., Rego, C., Oliveira, H., 2007. Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk diseases. Phytopathol. Mediterr. 46, 218-224.
- Nielsen, C.B., Cantor, M., Dubchak, I., Gordon, D., Wang, T., 2010. Visualizing genomes: techniques and challenges. Nat. Methods. 7, S5-S15.
- Nürnbergger, T., Brunner, F., 2002. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. Curr. Opin. Plant. Biol. 5, 318-324.
- Octave, S., Amborabe, B.E., Luini, E., Ferreira, T., Fleurat-Lessard, P., Roblin, G., 2005. Antifungal effects of cysteine towards *Eutypa lata*, a pathogen of vineyards. Plant. Physiol. Biochem. 43, 1006-1013.
- Paillassa, E., 1992. L'eutypiose de la vigne (*Eutypa lata* (Pers. : Tul.): Aspects épidémiologiques. Application à la mise au point d'évaluation des fongicides in vivo (Thesis). Université de Bordeaux 2, France.
- Parker, J., 2003. Plant recognition of microbial patterns. Trends. Plant. Sci. 8, 245-247.
- Petit, A.N., Vaillant, N., Boulay, M., Clément, C., Fontaine, F., 2006. Alteration of photosynthesis in grapevines affected by esca. Phytopathology. 96, 1060-1066.
- Picard, K., Tirilly, Y., Benhamou, N., 2000a. Cytological effects of cellulases in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4305-4314.

- Picard, K., Ponchet, M., Blein, J.P., Rey, P., Tirilly, Y., Benhamou, N., 2000b. Oligandrin. A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant. Physiol.* 124, 379-395.
- Pierron, R., 2013. Esca et vigne : compréhension des mécanismes de défense précoces du bois de la vigne *Vitis vinifera* L. suite à la maladie, colonisation des champignons in planta et proposition de moyens de lutte pour une viticulture durable (Thesis). Université de Toulouse, France.
- Pierron, R.J.G., Pages, M., Couderc, C., Compant, S., Jacques, A., Violleau, F., 2015. *In vitro* and *in planta* fungicide properties of ozonated water against the esca-associated fungus *Phaeoacremonium aleophilum*. *Sci. Hortic.* 189, 184–191.
- 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*. *Plant. Cell.* 10, 1571-1580.
- Pieterse, C.M.J., Van Pelt, J.A., Ton, J., Parchmann, S., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Métraux, J.P., Van Loon, L.C., 2000. Rhizobacteria mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 57, 123-134.
- Pieterse, C.M.J., Van Loon, L.C., 2007. Signalling cascades involved in induced resistance. In: Walters, D., Newton, A., Lyon, G. (Eds.), *Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection*. Blackwell, Oxford, UK, pp. 65-81.
- Pieterse, C.M.J., Zamioudis, C., Berendsen, R.L., Weller, D.M., Van Wees, S.C.M., Bakker, P.A.H.M., 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52, 347-375.
- Pineda, A., Zheng, S.J., Van Loon, J.J.A., Pieterse, C.M.J., Dicke, M., 2010. Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. *Trends. Plant. Sci.* 15, 507-514.

- Pitt, W.M., Huang, R., Steel, C.C., Savocchia, S., 2013. Pathogenicity and epidemiology of *Botryosphaeriaceae* species isolated from grapevines in Australia. *Australas. Plant. Pathol.* 42, 573–582.
- Poitras, E., Houde, A., 2002. La PCR en temps réel: Principes et applications. *Biol. Biotechnol. Rev.* 2, 1-11.
- Pouzoulet, J., 2012. Développement d'une méthodologie PCR en temps réel pour la détection et la quantification in planta des principaux champignons pathogènes associés aux maladies du bois de la vigne (Thesis). Université de Toulouse, France.
- Pouzoulet, J., Mailhac, N., Couderc, N., Besson, X., Dayde, J., Lummerzheim, M., Jacques, A., 2013. A method to detect and quantify *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* DNA in grapevine-wood samples. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 10163–10175.
- Pozo, M.J., Van der Ent, S., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J., 2008. Transcription factor MYC2 is involved in priming for enhanced defense during rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *New. Phytol.* 180, 511-523.
- Pré M., Atallah M., Champion, A., De Vos, M., Pieterse, C.M.J., Memelink, J. 2008. The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol.* 147, 1347-1357.
- Prost, I., Dhondt, S., Rothe, G., Vicente, J., Rodriguez, J., Kift, N., Carbonne, F., Griffiths, G., Esquerré-Tugayé, M.T., Rosahl, S., Castresana, C., Hamberg, M., Fournier, J., 2005. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant. Physiol.* 139, 1902-1913.
- Raaijmakers, J.M., Leeman, M., Van Oorschot, M.M.P., Van der Sluis, I., Schippers, B., Bakker, P.A.H.M., 1995. Dose-reponse relationships in biological control of *Fusarium wilt* of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology.* 85, 1075-1081.
- Rodriguez, M.C.S., Petersen, M., Mundy, J., 2010. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *An. Rev. Plant. Biol* 61, 621-649.

- Rappaz, F., 1984. Les especes sanctionnees du genre *Eutypa* (*Diatrypaceae*, Ascomycetes). Etude taxonomique et nomenclaturale. *Mycotaxon*. 20, 567-586.
- Ren, H., Lu, L.M., Soejima, A., Luke, Q., Zhang, D.X., Chen, Z.D., Wen, J., 2011. Phylogenetic analysis of the grape family (Vitaceae) based on the noncoding plastid *trnC-petN*, *trnH-psbA*, and *trnL-F* sequences. *Taxon*. 60, 629-637.
- Renault, A.S., Deloire, A., Bierne, J., 1996. Pathogenesis-related proteins in grapevines induced by salicylic acid and *Botrytis cinerea*. *Vitis*. 35, 49-52.
- Repka, V., Fischerova, I., Silharova, K., 2004. Methyl jasmonate is a potent elicitor of multiple defense responses in grapevine leaves and cell suspension cultures. *Biol. Plant*. 48, 273-283.
- Rey, P., Gl, F., Benhamou, N., Tirilly, Y., 2008. *Pythium oligandrum* biocontrol: its relationships with fungi and plants. In: Ait Barka, E., Clément, C. (Eds.), Plant–microbe interactions. Research Signpost, Kerala, pp. 43-67.
- Rey P, Benhamou N, Wulff E, Tirilly Y (1998a) Interactions between tomato (*Lycopersicon esculentum*) root tissues and the mycoparasite *Pythium oligandrum*. *Physiol Mol Plant Pathol* 53 (2):105–122
- Romanazzi, G., D’Ascenzo, D., Murolo, S., 2009. Field treatment with resistance inducers for the control of grapevine Bois Noir. *J. Plant. Pathol.* 91, 677-682.
- Ross, A.F., 1961. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology*. 14, 340–358.
- 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. Biol.* 9, 104.
- Rudrappa, T., Czymbek, K.J., Pare, P.W., Bais, H.P., 2008. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant. Physiol.* 148, 1547-1556.
- Rumbos, I., Rumbou, A., 2001. Fungi associated with esca and young grapevine decline in Greece. *Phytopathol. Mediterr.* 40, S330-S335.

- Ryals, J., 1996. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant. J.* 10, 71-82.
- Samadi, L., Shahsavan Behboodi, B., 2006. Fusaric acid induces apoptosis in saffron root-tip cells: Roles of caspase-like activity, cytochrome c, and H₂O₂. *Planta.* 225, 223-234.
- Sawant, S.D., Sawant, I.S., Shetty, D., Shinde, M., Jade, S., Waghmare, M., 2011. Control of powdery mildew in vineyards by Milastin K, a commercial formulation of *Bacillus subtilis* (KTBS). *J. Biol. Control.* 25, 26-32.
- Schmidt, C.S., Lorenz, D., Wolf, G.A., 2001. Biological control of the grapevine dieback fungus *Eutypa lata* I: Screening of bacterial antagonists. *J. Phytopathol.* 149, 427-435.
- Schornack, S., Huitema, E., Cano, L.M., Bozkurt, T.O., Oliva, R., van Damme, M., Schwizer, S., Raffaele, S., Chaparro-Garcia, A., Farrer, R., Segretin, M.E., Bos, J., Haas, B.J., Zody, MC., Nusbaum, C., Win, J., Thines, M., Kamoun, S., 2009. Ten things to know about oomycete effectors. *Mol. Plant. Pathol.* 10, 795-803.
- Shah, J., 2003. The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 6, 365-371.
- Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V.K., Dixon, R.A., Lamb, C., 1997. Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *The Plant Cell.* 9, 261-270.
- Slippers, B., Smit, W.A., Crous, P.W., Coutinho, T.A., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J., 2007. Taxonomy, phylogeny and identification of Botryosphaeriaceae associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. *Plant. Pathol.* 56, 128-139.
- Slippers, B., Wingfield, M.J., 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal. Biol. Rev.* 21, 90-106.
- Spagnolo, A., Larignon P., Magnin-Robert, M., Hovasse, A., Cilindre, C., Van Dorsselaer, A., Clément, C., Schaeffer-Reiss, C., Fontaine, F., 2014. Flowering as the most highly sensitive period of grapevine (*Vitis vinifera* L., cv Mourvèdre) to the botryosphaeria dieback agents *Neofusicoccum parvum* and *Diplodia seriata* infection. *Int. J. Mol.* 15, 9644-9669.

- Sparapano, L., Bruno, G., Graniti, A., 2001. Three-year observation of grapevines crossinoculated with esca-associated fungi. *Phytopathol. Mediterr.* 40, S376-S386.
- Sparapano, L., Bruno, G., Graniti, A., 2006. Effects on plants of metabolites produced in culture by *Phaeoacremonium chlamydosporum*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. *Phytopathol. Mediterr.* 39, 169–177.
- Stergiopoulos, I., De Wit, P.J.G.M., 2009. Fungal effector proteins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, 233-263.
- Sun, J.Q., Jiang, H.L., Li, C.Y., 2011. Systemin/jasmonate-mediated systemic defense signaling in tomato. *Mol. Plant.* 4, 607-615.
- Surico, G., Marchi, G., Braccini, P., Mugnai, L., 2000. Epidemiology of esca in some vineyards in Tuscany (Italy). *Phytopathol. Mediterr.* 39, 190-205.
- Tabacchi, R., Fkyerat, A., Poliart, C., Dubin, G.M., 2000. Phytotoxins from fungi of esca of grapevine. *Phytopathol. Mediterr.* 39, 156-161.
- Takahashi, H., Ishihara, T., Hase, S., Chiba, A., Nakaho, K., Arie, T., Teraoka, T., Iwata, M., Tugane, T., Shibata, D., Takenaka, S., 2006. Beta-cyanoalanine synthase as a molecular marker for induced resistance by fungal glycoprotein elicitor and commercial plant activators. *Phytopathology.* 96, 908–916.
- Takenaka, S., Nishio, Z., Nakamura, Y., 2003. Induction of defense reactions in sugar beet and wheat by treatment with cell wall protein fractions from the mycoparasite *Pythium oligandrum*. *Phytopathol.* 93, 1228–1232.
- Takenaka, S., Nakamura, Y., Kono, T., Sekiguchi, H., Masunaka, A., Takahashi, H., 2006. Novel elicitin-like proteins isolated from the cell wall of the biocontrol agent *Pythium oligandrum* induce defence-related genes in sugar beet. *Mol. Plant. Pathol.* 7, 325-339.
- Takenaka, S., Tamagake, H., 2009. Foliar spray of a cell wall protein fraction from the biocontrol agent *Pythium oligandrum* induces defence-related genes and increases resistance against *Cercospora* leaf spot in sugar beet. *J. Gen. Plant. Pathol.* 75, 340-348.
- Takenaka, S., Yamaguchi, K., Masunaka, A., Hase, S., Inoue, T., Takahashi, H., 2011. Implications of oligomeric forms of POD-1 and POD-2 proteins isolated from cell walls

- of the biocontrol agent *Pythium oligandrum* in relation to their ability to induce defense reactions in tomato. *J. Plant. Physiol.* 168, 972-979.
- Tambong, J.T., De Cock, A.W.A.M., Tinker, N.A., Levesque, C.A., 2006. Oligonucleotide array for identification and detection of *Pythium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2691-2706.
- Tey-Ruhl, P., Philippe, I., Renaud, J.M., Tsoupras, G., De Angelis, P., Fallot, J., Tabacchi, R., 1991. Eutypine, a phytotoxin produced by *Eutypa lata*, the causal agent of a dying arm disease of grapevine. *Phytochemistry.* 30, 471-473.
- Thiéry, D., Rey, P., 2015. Est-on désarmés face aux maladies qui affectent la « colonne vertébrale » de la vigne ? *Rev. Oenol.* 1-3.
- Thomma, B.P., Penninckx, I.A., Broekaert, W.F., Cammue, B.P., 2001. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 63-68.
- Torres, M.A., Jones, J.D.G., Dangl, J.L., 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant. Physiol.* 141, 373-378.
- Tran Manh Sung, C., Strizyk, S., Clerjeau, M., 1990. Simulation of the date of maturity of *Plasmopara viticola* oospores to predict the severity of primary infections in grapevine. *Plant. Dis.* 74, 120-124.
- Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Vernet, G., Aziz, A., 2006. Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 114, 405-413.
- Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Biagianti, S., Aziz, A., 2008. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environ. Exp. Bot.* 64, 21-32.
- Trouvelot, S., Varnier, A.L., Allegre, M., Mercier, L., Baillieul, F., Arnould, C., Gianinazzi Pearson, V., Klarzynski, O., Joubert, J.M., Pugin, A., Daire, X., 2008. A β -1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 21, 232-243.

- Truman, W., Bennett, M.H., Kubigsteltig, I., Turnbull, C., Grant, M., 2007. *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 1075-1080.
- Tseng, S.Y., Macool, D., Elliott, V., Tice, G., Jackson, R., Barbour, M., Amorese, D., 1997. An homogeneous fluorescence polymerase chain reaction assay to identify *Salmonella*. *Anal. Biochem.* 245, 207–212.
- Úrbez-Torres, J.R., Gubler, W.D., 2011. Susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*. *Plant. Pathol.* 60, 261-270.
- Vallance, J., Deniel, F., Barbier, G., Guerin-Dubrana, L., Benhamou, N., Rey, P., 2012. Influence of *Pythium oligandrum* on the bacterial communities that colonize the nutrient solutions and the rhizosphere of tomato plants. *Can. J. Microbiol.* 58, 1124-1134.
- Vallance, J., Le Floch, G., Deniel, F., Barbier, G., Levesque, C.A., Rey, P., 2009. Influence of *Pythium oligandrum* biocontrol on fungal and oomycete population dynamics in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4790-4800.
- Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M., Pieterse, C.M.J., 2009. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. *Phytochemistry.* 70, 1581-1588.
- Van Loon, L.C., 1997. *Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins*. *Eur. J. Plant. Pathol.* 103, 753-765.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 453-483.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., 2005. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In: Siddiqui, Z.A. (Eds), *PGPR: Biocontrol and biofertilization*. Springer, Dordrecht, the Netherlands, pp. 39 -66.
- Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J., 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *An. Rev. Phytopathol.* 44, 135-162.

- Van Wees, S.C., Van der Ent, S., Pieterse, C.M., 2008. Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 11, 443-448.
- Verhagen, B.W., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.S., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M., 2004. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 17, 895-908.
- Verhagen, B.W.M., Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Hofte, M., Aziz, A., 2010. *Pseudomonas* spp. induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine. *J. Exp. Bot.* 61, 249-260.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H., Ryals, J., 1994. Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant. Cell.* 6, 959-965.
- Viret, O., Bloesh, B., Taillens, J., Siegfried, W., Dupuis, D., 2001. Prévision et gestion des infections du mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*) à l'aide d'une station d'avertissement. *Revue. Suisse. Vitic. Arboric. Hortic.* 33, I-XII.
- Vollenweider, S., Weber, H., Stolz, S., Chételat, A., Farmer, E.E., 2000. Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased *Arabidopsis* leaves. *Plant. J.* 24, 467-476.
- Wicks, T., Davies, K., 1999. The effect of *Eutypa* on grapevine yield. *The Australian Grapegrower and Winemaker. Annu. Tech. Issue.* 426a, 15-16.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., Ausubel, F.M., 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature.* 414, 562-565.
- Wittstock, U., Gershenson, J., 2002. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Cur. Opin. Plant. Biol.* 5, 300-307.
- Wulff, E.G., Pham, A.T.H., Cherif, M., Rey, P., Tirilly, Y., Hockenhull, J., 1998. Inoculation of cucumber roots with zoospores of mycoparasitic and plant pathogenic *Pythium* species: differential zoospore accumulation, colonization ability and plant growth response. *Eur. J.Plant. Pathol.* 104, 69-76.

- Xiong, L., Zhu, J.K., 2001. Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives. *Physiol Planta* 112,152-166.
- Yacoub, A., Gerbore, J., Magnin, N., Chambon, P., Dufour, M.C., Corio-Costet, M.F., Guyoneaud, R., Rey, P., 2016. Ability of *Pythium oligandrum* strains to protect *Vitis vinifera* L., by inducing plant resistance against *Phaeoconiella chlamydospora*, a pathogen involved in Esca, a grapevine trunk disease. *Biol. Control*. 92, 7–16.
- Zanzotto, A., Autiero, F., Bellotto, D., Dal Cortivo, G., Lucchetta, G., Borgo, M., 2007. Occurrence of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeoconiella chlamydospora* in grape propagation materials and young grapevines. *Eur. J. Plant. Pathol.* 119, 183-192.
- Zhang, S.Q., Klessig, D.F., 2001. MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends. Plant. Sci.* 6, 129-136.
- Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 23, 283-333.
- Zimmerli, L., Jakab, G., Mettraux, J.P., Mauch-Mani, B., 2000. Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by β -aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 12920-12925.
- Zinger, L., Gury, J., Giraud, F., Krivobok, S., Gielly, L., Taberlet, P., Geremia, R.A., 2007. Improvements of polymerase chain reaction and capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism methods in microbial ecology: toward a high-throughput method for microbial diversity studies in soil. *Microb. Ecol.* 54, 203–216.

Annexes

CURRICULUM VITAE

PUBLICATIONS INTERNATIONALES A COMITE DE LECTURE

- Yacoub, A.**, Gerbore, J., Magnin, N., Dufour, M.C., Corio-Costet, M. F., Guyoneaud, R., Rey, P., 2016. Ability of *Pythium oligandrum* strains to protect *Vitis vinifera* L., by inducing plant resistance against *Phaeomoniella chlamydospora*, a pathogen involved in Esca, a grapevine trunk disease. Biol. Control 92, 7-16.
- Gerbore, J., Vallance, J., **Yacoub, A.**, Delmotte, F., Grizard, D., Regnaut Roger, C., Rey, P., 2014. Characterization of *Pythium oligandrum* populations that colonize the rhizosphere of vines from the Bordeaux region. FEMS Microbiol. Ecol. 90, 153–167.
- Chebil, S., Fersi, R., **Yacoub, A.**, Chenenaoui, S., Chattaoui, M., Melki, I., Zemni, H., Rhouma, A., Durante, G., Zacchi, E., Mliki, A., 2012. First report of *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata* and *Neofusicoccum lutueum* associated with canker and dieback of grapevines in Tunisia. Plant Dis. 98, 3, 420.
- Yacoub, A.**, Gerbore, J., Compant, S. Guyoneaud, R., Rey, P. Biological control of major grapevine foliar, grapes and trunk diseases using fungi and oomycetes. (sera envoyée à la revue Australian Grapevine Journal of Research).
- Yacoub, A.**, Magnin, N., Gerbore, J., Bruez, E., Grizard, D., Compant, S., Guyoneaud, R., Rey, P. High-throughput transcriptional analyses of a tri-partite interaction between an oomycete biocontrol agent, *Pythium oligandrum*, a pathogen, *Phaeomoniella chlamydospora*, involved in Esca, a Grapevine Trunk Disease, and *Vitis vinifera* L. (en preparation).
- Berger, H., **Yacoub, A.**, Gerbore, J., Grizard, D., Rey, P., Sessitsch, A. and Compant. S. Draft genome sequence of the biocontrol agent *Pythium oligandrum* Po37. Genome Announcement (en preparation).

ACTES DE CONGRES

- Ben Ghnaya-Chakroun A., Y. Mastouri, A. Rezgui, J. Vallance, **A. Yacoub**, P. Rey, N. Sadfi-Zouaoui, L. Hamrouni. 2015. Maladies du bois de la vigne en Tunisie: communautés fongiques et utilisation d'huiles essentielles comme moyen de lutte. 5ème Conférence Internationale sur les Méthodes Alternatives en Protection des Cultures, Lille, France. Pages 177-185.
- Yacoub, A.**, Gerbore, J., Magnin, N., Dufour, M.-C., Corio-Costet, M.-C., Guyoneaud, R., Rey P, 2015. Protection contre l'Esca, une maladie du bois de la vigne, par utilisation

de l'oomycète *Pythium oligandrum*. AFPP – cinquième conférence internationale sur les méthodes alternatives de protection des plantes, 11-13 mars 2015 Lille –France.

Rey P, Bruez E, Gerbore J, **Yacoub A**, Rezgui A, Ouhaibi N, Vallance J, Ben Ghnaya A, Sadfi-Zouaoui N. Biotechnologies et protection des végétaux : intérêt de la microflore colonisatrice des plantes. Symposium international des 100 ans de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie, « Sécurité alimentaire et développement durable : les défis de la recherche agronomique », 27 et 28 novembre 2013, Gammarth, Tunisie. Soumis.

PUBLICATIONS DE VULGARISATION

Gerbore, J., **Yacoub, A.**, Benhamou, N., Barka, E.A., Fontaine, F., Rey, P., 2013. Des micro-organismes pour protéger les cultures. Biofutur, 343:43-45

Yacoub, A., Gerbore, J., Magnin, N., Dufour, M.-C., Corio-Costet, M.-C., Guyoneaud, R., Rey P (2015) *Pythium oligandrum* testé contre l'esca de la vigne. Phytoma, 682, 32-35.

CHAPITRE D'OUVRAGE

Rey P., **Yacoub A**, Gerbore J. Utilisation d'un oomycete pour lutter contre une maladie du bois de la vigne, l'esca. Encart dans l'ouvrage de Phytopathologie de Lepoivre (en cours).

COMMUNICATIONS A DES CONGRES PARUES DANS DES JOURNAUX AVEC FACTEUR IMPACT (IF)

Yacoub A., Gerbore J., Magnin N., Vallance J., Grizard D., Guyoneaud R., Rey P. 2014. Induction of grapevine defence systems using the oomycete *Pythium oligandrum* against a pathogenic fungus involved in esca. 9th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases (9IWGTD), 18-20 Novembre 2014-Adelaide, Australia (Phytopathologia Mediterranea, 53(3): 574-575).

COMMUNICATIONS LORS DE CONGRES

(*=Communications orales personnellement présentées)

Gerbore J., Magnin N., Bruez E., **Yacoub A.**, Grizard D., Regnaultroger C., Rey P. 2013. Lutte biologique contre un champignon impliqué dans l'esca par utilisation de l'oomycète *Pythium oligandrum* : analyse de la résistance induite. Journées maladies du bois, 19-20 mars 2013, Angers, France.

***Yacoub A.**, Gerbore J., Magnin N., Dufour M.C., Corio-Costet M. F., Guyoneaud R., Rey P. 2014. *Vitis vinifera* resistance induced by *Pythium oligandrum* to control a pathogenic fungus involve in esca, a major grapevine trunk disease. IOBC workshop, "Biocontrol of Plant Diseases: From the field to the laboratory and back again", 16-18 Juin 2014 SLU-Uppsala, Sweden. (Communication orale)

***Yacoub A.**, Bruez E., Gerbore J., Rezgui A., Vallance J., Ben Ghnaya-Chakroun, Sadfi-Zouaoui N., Guyoneaud R., Rey P. Investigating the indigenous plant beneficial microorganisms that naturally colonize the grapevine. IOBC workshop, "Biocontrol of Plant Diseases: From the field to the laboratory and back again", 16-18 Juin 2014 SLU-Uppsala, Sweden. (Communication orale)

Gerbore J., **Yacoub A.**, Vallance J., Magnin N., Delmotte F., Grizard D. And Rey P. Rhizosphere of grapevines from the Bordeaux region is frequently colonized by strains of the oomycete, *Pythium oligandrum*. IOBC workshop, "Biocontrol of Plant Diseases: From the field to the laboratory and back again", 16-18 Juin 2014 SLU-Uppsala, Sweden.

***Yacoub A.**, Gerbore J., Magnin N., Vallance J., Grizard D., Guyoneaud R., Rey P. Analyse de la résistance induite chez *Vitis vinifera* par l'oomycète *Pythium oligandrum* afin de lutter contre un champignon pathogène impliqué dans l'esca, *Phaeomoniella chlamydospora*. Congrès INRA SPE, 3-5 Juin 2014 Bordeaux, France. (Communication orale)

***Yacoub A.**, Gerbore J., Magnin N., Dufour M.C., Corio-Costet M. F., Guyoneaud R., Rey P., 2014. Ability of three inocula of *Pythium oligandrum* to protect *Vitis vinifera* against *Phaeomoniella chlamydsopora*, a pathogen involved in esca, by inducing plant resistance. COST Action FA 1303 Meeting "Sustainable control of Grapevine Trunk Diseases: current state and future prospects", 23-24 Juin 2015. Cognac, France. (Communication orale)

***Yacoub A.**, Gerbore J., Magnin N., J., Vallance, J., Douillet A., Candido da Costa D., Guyoneaud, R., Rey P., 2015. "Colonisation de la rhizosphère de jeunes plants de vigne greffés par l'agent de biocontrôle, *Pythium oligandrum*, et protection contre *Phaeomoniella chlamydospora*". Journées maladies du bois, 17-18 Novembre 2015, Colmar, France (Communication orale).

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

- Yacoub A.**, Gerbore J., Magnin N., Dufour M.C., Corio-Costet M.F., Guyoneaud R., Rey P, 2014. Analyse de la résistance induite chez *Vitis vinifera* par l'oomycète *Pythium oligandrum* afin de lutter contre un champignon pathogène impliqué dans l'esca, *Phaeomoniella chlamydospora*. Sixième journées des doctorants INRA-SPE, 3-5 Juin 2014, Bordeaux, France.
- Yacoub, A.**, Gerbore, J., Magnin, N., Dufour, M.-C., Corio-Costet, M.-C., Guyoneaud, R., Rey P, 2015. Protection contre l'Esca, une maladie du bois de la vigne, par utilisation de l'oomycète *Pythium oligandrum*. AFPP – cinquième conférence internationale sur les méthodes alternatives de protection des plantes, 11-13 mars 2015 Lille, France.
- Yacoub, A.**, Gerbore, J., Vallance, J., Bruez E., Douillet A., Candido da Costa D., Guyoneaud, R., Rey P., 2015. Influence de l'agent de biocontrôle, *Pythium oligandrum*, sur les communautés microbiennes indigènes colonisant les ceps de vigne. VIIème colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne, 3-5 Novembre 2015, Anglet, France.

Relations entre l'oomycète, *Pythium oligandrum*, et la vigne : étude de l'induction de résistance contre un agent pathogène du bois et impact sur les communautés microbiennes colonisant la plante

Il est actuellement estimé qu'environ 13% du vignoble français est improductif suite aux pathologies affectant le bois des ceps, la principale d'entre elles étant l'esca. Parmi les moyens de lutte mis en œuvre, le biocontrôle, via l'utilisation d'un oomycète, *Pythium oligandrum*, est actuellement développé pour protéger les plants de vigne contre un agent pathogène pionnier de l'esca, *Phaeoconiella chlamydospora*.

La sélection de souches de *P. oligandrum*, isolées du vignoble, et produisant *in vitro* des quantités importantes d'une protéine élicitrice, l'oligandrine, des systèmes de défense des végétaux a d'abord été réalisée. Trois essais en serre ont montré qu'une réduction significative (40 à 50%) des nécroses dues *P. chlamydospora* était observée après application d'inocula de l'oomycète sur les racines des plants de vigne pied-francs Au niveau de la tige, le niveau d'expression de 22 gènes impliqués dans les mécanismes de défenses de *Vitis vinifera* a été mesuré par PCR quantitative et des réponses spécifiques du végétal ont été observées selon les traitements. Six gènes (protéines PR, voie des phenylpropanoïdes, oxylipines et le système d'oxydo-réduction) ont été fortement induits lorsque les plants ont été pré-inoculés par *P. oligandrum* puis infectés par *P. chlamydospora*.

Afin de mettre en évidence les mécanismes spécifiques mis en place lors de cette interaction tripartite, l'analyse de la réponse transcriptomique globale de la vigne (par microarray et RNAseq), au niveau de la tige, a été réalisée chez ces plants qui manifestent une résistance induite systémique (ISR). Plusieurs gènes impliqués dans la synthèse de l'éthylène et des jasmonates sont fortement induits, chez les plants pré-traités par l'oomycète puis infectés par l'agent pathogène. Plusieurs facteurs de transcription régulant ces voies de signalisation sont également fortement induits. Suite à l'analyse des populations de messagers (mRNA) de *P. chlamydospora*, il a été observé que les niveaux d'expression de gènes impliqués dans la synthèse des métabolites secondaires, des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de différentes voies chez les champignons et certaines Carbohydrates Actives enZymes étaient modulés en présence de *P. oligandrum* au niveau racinaire. Ces résultats montrent que la colonisation du végétal par l'oomycète, même à distance de *P. chlamydospora*, induit un stress indirect important chez celui-ci.

Afin d'optimiser l'implantation de cet agent de biocontrôle en pépinière et au vignoble, l'aptitude de *P. oligandrum* à coloniser les racines de plants de vignes greffés et à les protéger contre *P. chlamydospora* a été étudiée. Trois portes-greffes (SO4, 3309 et 101-14) greffés sur des cépages (Cabernet Sauvignon et Sauvignon Blanc) ont été inoculés ou non par *P. oligandrum*. L'oomycète s'implantait sur les différents systèmes racinaires, mais en proportion variable selon les associations cépage/porte-greffe utilisées. Les analyses par empreintes moléculaires (Single Strand Conformation Polymorphism) ont montré que des microflores fongiques et bactériennes complexes et diversifiées colonisaient les feuilles et les racines, mais que l'introduction de *P. oligandrum* sur la plante n'induisait pas de bouleversements directs ou indirects notables au niveau de ces microflores indigènes. Une protection des jeunes plants de vigne greffés (SO4 + Cabernet Sauvignon) semble être induite par *P. oligandrum* contre l'agent pathogène, *P. chlamydospora*.

Mots clés: biocontrôle, *P. oligandrum*, esca, maladie du bois, *P. chlamydospora*, résistance systémique induite, plants greffés

Relationships between the oomycete, *Pythium oligandrum*, and grapevines: induced resistance against a trunk wood pathogen and impact on plant microbial communities

Approximately 13% of French vineyards are currently considered unproductive due to trunk diseases, mainly Esca, a particularly destructive disease that affects grapevines worldwide. Accordingly, biological control of a pathogen implicated in Esca, *Phaeomoniella chlamydospora*, was developed using the oomycete, *Pythium oligandrum*.

The selection of *P. oligandrum* strains, isolated from vineyards, which produced *in vitro* large quantities of oligandrin, an elicitor-like protein inducing plant defences, was carried out. Three greenhouse assays showed that the necroses caused by *P. chlamydospora* were significantly reduced (40 to 50%) when *P. oligandrum* colonized the root system of vine cuttings. At stem level, the expression of a set of 22 genes involved in *Vitis vinifera* defence mechanisms was measured by quantitative PCR. Depending on the treatments employed, significant differences in grapevine responses were observed. Six of the genes (PR proteins, phenyl-propanoid pathway, oxylipins and the oxydo-reduction system) were strongly induced in plants pre-treated with *P. oligandrum*, and subsequently infected by *P. chlamydospora*.

In order to characterize the mechanisms occurring during this tri-partite interaction, the global transcriptomic grapevine responses at stem level were analysed, using microarray and RNAseq, in plants in which induced systemic resistance (ISR) had taken place. Several genes involved in ethylene and jasmonate biosynthesis were strongly induced in plants that were pre-treated with *P. oligandrum*, and subsequently infected by *P. chlamydospora*. The transcription factors involved in the regulation of these signalisation pathways were also induced. Analysis of the *P. chlamydospora* RNA messenger (mRNA), showed that certain genes involved in secondary metabolite synthesis, transcription factors implicated in pathway regulations, and certain Carbohydrate Active enZymes, were modulated, when *P. oligandrum* colonised the roots. These results demonstrated that root inoculation with *P. oligandrum* induced indirect stress on *P. chlamydospora* responses.

In order to promote *P. oligandrum* implantation in nurseries and vineyards, the capacity of this biocontrol agent to colonize the roots of grafted-plants, and to protect them against *P. chlamydospora* attacks, was studied. Three rootstocks (SO4, 3309 and 101-14), grafted on two scion varieties (Cabernet Sauvignon and Sauvignon Blanc), were inoculated or not with *P. oligandrum*. Depending on the particular scion/rootstock associations, the oomycete colonized the various root systems differently. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) analyses revealed complex and diverse fungal and bacterial communities in both the rhizosphere and the phyllosphere. These microflora, which were organ-dependent, were not directly or indirectly affected by the root inoculation of *P. oligandrum*. Protection of grafted vines (SO4 + Cabernet Sauvignon) was probably induced by *P. oligandrum* against the pathogen, *P. chlamydospora*.

Keywords: biocontrol, *P. oligandrum*, esca, grapevine trunk diseases, *P. chlamydospora*, induced systemic resistance, grafted plants

