



# UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR

## THÈSE

Pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR

*Ecole Doctorale des Sciences Exactes et Leurs Applications ED211*  
Spécialité : Sciences Agronomiques, Biotechnologies agro-alimentaires

Par

**Jonathan Gerbore**

---

Lutte biologique contre un champignon pathogène  
impliqué dans l'esca de la vigne, par utilisation de  
l'oomycète *Pythium oligandrum*

---

Soutenance le 24 octobre 2013 devant le jury composé de

Essaïd Ait Barka Professeur Université de Reims Champagne Ardenne	Examineur
Emile Benizri Professeur Université de Lorraine	Rapporteur
Christophe Bertsch Professeur Université de Haute Alsace	Examineur
Damien Grizard Docteur Biovitis	Membre invité
Monica Höfte Professeur Université de Ghent	Rapporteur
Catherine Regnault-Roger Professeur Univ. de Pau et des Pays de l'Adour	Co-directrice
Patrice Rey Professeur Bordeaux Sciences Agro	Co-directeur



# Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire INRA, Santé et Agroécologie du Vignoble, dans le cadre d'une thèse CIFRE financée par la société Biovitis.

Mes premiers remerciements vont tout naturellement vers mes encadrants de thèse, Mr Patrice Rey et Mme Catherine Regnault-Roger, qui m'ont fait confiance tout au long de ces trois années. Patrice, je te suis très reconnaissant pour tes conseils au quotidien et tes encouragements. Merci Catherine pour vos conseils et le temps consacré à la relecture de mon manuscrit.

Je souhaite remercier Denis Thiéry, directeur de l'UMR Santé et Agroécologie du Vignoble pour son accueil au sein du laboratoire.

Pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à mes recherches en acceptant de juger ce travail, je tiens à remercier Madame le professeur Monica Höfte et Monsieur le professeur Emile Benizri, rapporteurs de ce manuscrit. Je remercie également Monsieur le professeur Essaïd Ait Barka et Monsieur le professeur Christophe Bertsch d'avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse.

Ces 3 années de thèses m'ont donné l'opportunité de collaborer avec plusieurs équipes de recherche. Je souhaite ainsi remercier Mr Michel Ponchet et Mr Benoit Industri de l'INRA Sophia Antipolis, pour le temps que vous m'avez accordé et votre accueil chaleureux. Merci à Mr Jean-Marie Schmitter et Mr Luc Negroni du laboratoire de CBMN de l'université Bordeaux 2, pour ces moments passés ensemble, dommage que les manip n'aient pas fonctionné. Bon courage Luc pour la dernière ligne droite ! J'ai également eu le plaisir de collaborer avec l'équipe du laboratoire LVBE de l'université de Haute-Alsace menée par Christophe Bertsch. Un grand merci à Flore, Hélène et Christophe, pour votre accueil dans cette magnifique contrée, votre aide et pour les discussions scientifiques passionnantes tout au long de ces courtes journées. J'espère revenir pour la suite des manip...

Je tiens à remercier l'équipe de Biovitis, Damien, Gérard, Delphine et les autres, pour votre aide et votre disponibilité, notamment dans la production de *P. oligandrum* au fil des expérimentations. Merci également pour la confiance que vous m'avez accordée.

Plusieurs personnes ont eu la gentillesse de discuter avec moi de mes résultats, de mes statistiques ou de relire des manuscrits. Merci à François Delmotte, Lionel Delbac, et surtout à Jessica alias œil de lynx. Merci Jessica pour ton soutien et ta disponibilité à tout moment, depuis le master déjà ! Bientôt tu pourras te poser... enfin il faut l'espérer.

Je dis un grand merci à mes collègues de bureau, Emilie et Mélanie, qui m'ont abandonné à la fin de ma thèse mais avec qui j'ai partagé des moments inoubliables : le vendredi pain au chocolat, les sapins de Noël, les « ça m'énerve ! » en musique et également les galères où nous nous sommes toujours soutenus. « Entre thésards on se comprend ! »

Je tiens à remercier toutes les personnes du laboratoire qui ont directement ou indirectement concouru à la réalisation de ce travail, pour leurs conseils, leur bonne humeur et tous les moments partagés ensemble. Gilles, merci pour le café du matin qui permet de tenir 2 jours éveillé et pour ton aide lors des manips sur l'oïdium. Yo-Yo, merci pour ta gentillesse et ton aide lors des prélèvements et de la préparation des racines de vigne. Je tiens également à remercier Marie-Cécile et Marie-France pour les différentes discussions sur les gènes de défense, la PCRq et leur collaboration. Merci Amira pour ton aide, principalement lors de ton stage de Master, ainsi que pour l'excellent travail que tu as réalisé. Bon courage pour ta thèse ! Merci Noël pour ton aide plus qu'indispensable pour les analyses microarrays et pour nos discussions sur la problématique de l'esca... Merci Olivier pour ton excellent coaching sportif ! Je souhaite également remercier Dominique pour son aide en tant que pathologiste mycologue de grande classe !

Merci à tous les amis du Badminton grâce à qui j'ai pu me changer les idées (Vous êtes venus à bout du genou d'Emilie mais le mien est intact).

Enfin je voudrais dire un grand merci à ma famille qui m'a soutenue durant ces trois années.

Une mention toute particulière pour toi Bérengère, pour ta patience et ton courage depuis le début de cette longue, très longue aventure ! Merci pour tous les sacrifices que tu as fait afin que je me concentre entièrement à ma thèse.

Et merci à mes 3 rayons de soleil ! Promis à Noël, on part pour de vraies vacances !

# Résumé

Les recherches sur la lutte biologique (ou biocontrôle) par utilisation de micro-organismes connaissent un essor remarquable, les applications au champ étant cependant encore limitées en raison des variations d'efficacité dans la protection des plantes. Celles-ci sont souvent imputées à la non persistance des agents de biocontrôle dans la rhizosphère ou sur le végétal qu'ils sont censés protéger. Afin de réduire ce risque, une solution consiste à utiliser des micro-organismes isolés du végétal que l'on souhaite protéger.

Dans le cadre de cette thèse, *Pythium oligandrum*, un oomycète colonisateur de la rhizosphère de nombreuses plantes dont la vigne, a été étudié pour lutter contre l'esca, une maladie du bois de la vigne pour laquelle il n'existe actuellement aucune méthode de lutte disponible.

Des souches de *P. oligandrum* ont été isolées de la rhizosphère de ceps cultivés dans 3 régions viticoles (12 vignobles) du Bordelais présentant des sols variés : argilo-calcaire, sable-graveleux et graveleux. Les analyses des communautés fongiques et bactériennes obtenues par empreinte moléculaire (Single Strand Conformation Polymorphism) ont montré que, contrairement aux bactéries, les espèces fongiques différaient selon les régions. Des *Pythium* spp. aux oospores échinulées ont été isolées à partir des racines des ceps échantillonnés, avec une prédominance de *P. oligandrum* (séquençage de la région ITS). L'analyse des séquences des gènes codant pour le cytochrome oxydase I et une tubuline a permis de constituer 3 groupes de souches. Le séquençage d'autres gènes codant pour des protéines « élicitines-like » a indiqué que chaque souche présentait au moins un gène codant pour chacun des 2 types d'éliciteurs de *P. oligandrum* : l'oligandrine et les protéines de la paroi cellulaire (CWPs). Il apparaît que le type de sol et la microflore associée à la rhizosphère n'exerceraient pas une influence suffisante pour que la structure génétique des populations de *P. oligandrum* soient associées à un contexte tellurique particulier. En revanche, le type de porte-greffe et la méthode de désherbage (chimique ou mécanique) pourraient avoir une incidence sur la colonisation racinaire par *P. oligandrum*.

Les relations entre *P. oligandrum* et les racines de la vigne ont été étudiées par analyse transcriptomique (microarray *Vitis vinifera* de 29 549 gènes). Les résultats obtenus montrent que de jeunes plants de vigne ont répondu à la colonisation racinaire par *P. oligandrum* en modifiant l'expression de gènes intervenant dans plusieurs voies métaboliques. Deux aspects *a priori* opposés ont été observés : *P. oligandrum* serait perçu comme (1) un agresseur contre lequel la plante a mis en place des réactions de défense mais en même temps, comme (2) un micro-organisme symbiotique car un certain nombre de modifications transcriptionnelles étaient similaires à celles reportées dans les interactions rhizosphériques symbiotiques (e.g. forte stimulation de gènes codant pour des subtilases).

Un essai visant à induire chez la vigne une protection contre un champignon pathogène impliqué dans l'esca, *Phaeoconiella chlamydospora*, grâce à *P. oligandrum*, a été réalisé. La colonisation des racines par *P. oligandrum* a été associée à une réduction de la longueur des nécroses dues à *P. chlamydospora*. En adéquation avec ce résultat, l'analyse transcriptomique par RT-PCRq et microarrays a montré une surexpression de la voie de l'éthylène. Plusieurs gènes spécifiquement induits constitueraient des marqueurs de résistance qu'il conviendra de valider lors de prochaines expérimentations.

Mots clés : biocontrôle, élicitines-like protéines, esca, maladies du bois, microflore tellurique, *Pythium oligandrum*, *Phaeoconiella chlamydospora*, résistance induite

# Abstract

Biocontrol research based on the use of microorganisms is expanding very rapidly. However, the use of such biocontrol agents is still too inconsistent to effectively protect plants in field applications. This phenomenon is often attributed to the non-persistence of biocontrol agents in the rhizosphere or on the plants. In order to reduce the risk of this happening, one solution consists in using microorganisms that are isolated from the plants needing protection.

In this thesis, an oomycete called *Pythium oligandrum*, which colonizes the rhizosphere of many plants, including grapevine, was assessed for the control of esca, a grapevine trunk disease for which no control method is currently available.

*P. oligandrum* strains have been isolated from the rhizosphere of vines cultivated in 3 wine-growing regions (12 grapevines) of Bordeaux with different types of soil: stony-sandy, silty and stony. Analyses of fungal and bacterial communities using a molecular fingerprinting method (Single Strand Conformation Polymorphism) showed that, unlike bacteria, the fungal species varied according to the sampling region. Roots of all the vines sampled were colonized by echinulated-oospore *Pythium* spp., with *P. oligandrum* strains predominating. Phylogenetic analyses based on the genes encoding the cytochrome oxidase I and one tubulin allowed these strains to be clustered into three groups. The sequencing of the elicitor-like genes, whose proteins are key components in inducing systemic resistance in plants, showed that each strain held at least one gene encoding for each of the two kinds of *P. oligandrum* elicitors (*i.e.* oligandrin and Cell Wall Proteins). Sequencing and molecular fingerprinting analyses showed thus that the type of soil and the rhizosphere microbiota did not shape the population structure of *P. oligandrum*. However, other factors such as the different kinds of rootstock and weeding management can also have an influence on the root colonization by *P. oligandrum*.

The relationship between *P. oligandrum* and grapevine was studied using a transcriptomic approach (*microarray Vitis vinifera*, 29 549 genes). The results highlighted the modifications induced by young vines in response to *P. oligandrum* root colonization, in the genetic expression of several genes belonging to different metabolic pathways. Two aspects, that are usually opposed, were observed: *P. oligandrum* was perceived by the plant either (i) as a pathogen because certain defence reactions were triggered (*e.g.* calcium signalling, resistance genes, abscissic acid metabolism) or as (ii) a symbiotic microorganism since several transcriptional changes were similar to those reported in symbiotic interactions (*e.g.* induction of subtilase genes).

An assay aimed at protecting grapevine against a pathogenic fungus involved in esca, and known to be responsible for wood necrosis, *i.e.* *Phaeoaniella chlamydospora*, was carried out. The root colonization by *P. oligandrum* was associated with a reduction in the length of necroses. In line with this result, transcriptomic analyses by microarrays and RT-qPCR showed overexpression of several genes, particularly those of the ethylene pathway. Some of these induced genes could be thus used as resistance markers, but this needs to be validated in further experiments.

Keywords : Biocontrol, elicitor-like proteins, esca, grapevine trunk diseases, induced resistance, *Pythium oligandrum*, *Phaeoaniella chlamydospora*, soil microflora

# Glossaire

**ACC** : Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique

**AJ** : Acide jasmonique

**ANTS** : Anthranilate synthase

**AP2/ERF** : Apetala2 / ethylene-responsive factor

**ARN** : Acide ribonucléique

**AS** : Acide salicylique

**bHLH** : Basic helix loop helix

**CAGT** : Coniferyl alcohol glucosyl transferase

**CALS** : Callose synthase

**CBF** : Histone-like transcription factor

**CBS** : Centraalbureau voor Schimmelcultures au Pays-Bas

**CHIT3** Chitinase de classe 3

**CHIT4** Chitinase de classe 4

**CHO** :Carbone hydrogène oxygène

**CHORM** Chorismate mutase

**CHORS** : Chorismate synthase

**CHS** : Chalcone synthase

**CT**: Cycle threshold

**CTAB** : Céthyl triméthyl-ammonium bromide

**CWP** : Cell wall protein

**DAD** : *Diode* array detector

**DAMP** : damage-associated molecular pattern

**EDS1** : Enhanced disease susceptibility 1

**EDTA** : Ethylène diamine tétracétique

**EF1 $\gamma$**  : Chaîne  $\gamma$  du facteur d'élongation 1

**ELP** : Elicitin like protein

**ER** : Expression relative

**ET** : Ethylène

**ETI** : Effector-triggered immunity

**FAO** : Forme active de l'oxygène

**GAPDH** : Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase

**GLU** :  $\beta$  1-3 glucanase

**GST** : Glutathione S-transférase

**HPLC** : Chromatographie liquide haute performance

**JPI** : Jour post inoculation

**LAR** : Local acquired resistance

**LEDI** : *Lithospermum erythrorhizon* dark-inducible proteins

**LOX-9** : Lipoxygénase-9

**LRR** : Leucine reach repeat

**LTP** : Lipid transfert protein

**MAMP** : Microbial-associated molecular pattern

**MAPK** : MAP kinase

**MAPKK** : MAPK kinase

**MAPKKK** : MAPKK kinase

**MeJA** : Méthyl jasmonate

**MsR1** : Macrophage scavenger receptor 1

**MYB** : Myéloblastose

**NBS** : Nucleotide binding site

**NO** : Oxyde nitrique

**PAD4** : Phytoalexin deficient 4

**PAL** : Phénylalanine ammonia-lyase

**PAMP** : Pathogenic-associated molecular pattern

**PER** : Peroxydase

**PGIP** : Protéine inhibant les polygalacturonases

**PIN** : inhibiteur de protéase

**PRR** : Pattern-recognition receptor

**PTI** : PAMP-triggered immunity

**PVPP** : Poly-vinyl poly-pyrrolidone

**RH** : Réaction d'hypersensibilité

**RIN** : RNA integrity number

**Rpm** : Rotations par minute

**SAR** : Résistance systémique acquise

**STS** : Stilbène synthase



# Table des matières

	<b>01 Préambule</b>
Chapitre 1	<b>03 Introduction générale</b>
	01 La viticulture
	17 Le biocontrôle par utilisation de micro-organismes
	25 Publication 1: Biological control of plant pathogens : advantages and limitations seen through the case study of <i>Pythium oligandrum</i>
	39 Les systèmes de défense chez les végétaux
Chapitre 2	<b>53 Objectifs et démarche</b>
Chapitre 3	<b>59 <i>Pythium oligandrum</i> agent colonisateur de la rhizosphère de vigne : écologie, diversité et protection des plantes</b>
	63 Publication 2: Population structure of the oomycete, <i>Pythium oligandrum</i> , is not shaped by abiotic and biotic factors in the vineyards
Chapitre 4	<b>111 Etude transcriptomique de l'interaction <i>Vitis vinifera</i> / <i>P. oligandrum</i></b>
	111 Introduction
	116 Matériels et Méthodes
	123 Résultats
	141 Discussion-conclusions
Chapitre 5	<b>147 Etude transcriptomique de l'interaction <i>Vitis vinifera</i> / <i>P. oligandrum</i> / <i>P. chlamydospora</i></b>
	147 Introduction
	150 Matériels et Méthodes
	158 Résultats
	184 Discussion-conclusions
Chapitre 6	<b>191 Discussion générale et conclusions</b>
Chapitre 7	<b>203 Perspectives</b>
	<b>207 Références bibliographiques</b>
	<b>248 Annexes</b>



# Préambule

L'agriculture actuelle est en mutation comme l'indique le récent ouvrage de Regnault *et al.* (2012) sur les révolutions agricoles. Après la généralisation de l'utilisation d'engrais chimiques et de produits phytosanitaires qui a permis des augmentations considérables au niveau des rendements au XX<sup>ème</sup> siècle, l'essor des biotechnologies et de nouvelles techniques culturales est en cours. Le prochain défi qui devra être relevé consistera à nourrir d'ici 2050 environ 9 milliards d'êtres humains. Dans ce contexte, une des préoccupations majeures est d'augmenter les capacités de production des aliments, dont ceux issus des végétaux, tout en préservant l'environnement.

Au niveau des productions végétales, la protection, actuellement encore largement réalisée par l'application de produits phytosanitaires chimiques, est elle aussi dans une phase de transition. L'intégration progressive de nouvelles pratiques tenant compte non seulement de la dimension environnementale, mais aussi de la dimension socio-économique, est requise. Parmi les moyens de protection des végétaux, la lutte biologique, ou biocontrôle, par utilisation de micro-organismes est une voie possible pour minimiser la pollution et les nuisances associées à l'utilisation de produits chimiques de synthèse et réduire fortement leur impact négatif sur l'environnement.

Le concept de biocontrôle est devenu un enjeu technologique, économique et politique important pour développer une agriculture durable à un moindre coût écologique. À titre d'exemple, les Pays-Bas ont mis en place, dès 1990, le *Multi-Year Crop Protection Plan* qui prévoyait une réduction de l'ordre de 50 % de l'utilisation de pesticides pour l'an 2000. Au Canada, des objectifs similaires ont été émis dans la province de l'Ontario qui a investi plusieurs millions de dollars pour concrétiser un plan de réduction des produits chimiques phytosanitaires (N. Benhamou communication personnelle). En France, le plan Ecophyto 2018 prévoit également une réduction de plus de 50 % des intrants chimiques d'ici cinq ans ([www.agriculture.gouv.fr/Ecophyto](http://www.agriculture.gouv.fr/Ecophyto)). Ces mesures illustrent, sans équivoque, une prise de conscience majeure face à l'accumulation de résidus toxiques dans l'environnement et dans les maillons de la chaîne alimentaire. Elles indiquent aussi le manque d'alternatives pour

réduire la dépendance du secteur agricole envers les pesticides.

Dans ce contexte, il apparaît important d'approfondir les connaissances sur le biocontrôle pour améliorer son utilisation et son efficacité. Le sujet de la présente thèse a pour objectif général d'étudier les capacités d'un de ces micro-organismes, un oomycète nommé *Pythium oligandrum*, utilisé depuis plusieurs années comme agent de biocontrôle (Benhamou *et al.* 2012 ; Gerbore *et al.* 2013 ; Rey *et al.* 2008). Dans le cas présent, il s'agira d'estimer son aptitude à protéger une culture d'importance économique majeure, la vigne, contre l'agression par un agent pathogène, *Phaeomoniella chlamydospora*. Ce micro-organisme est impliqué dans l'esca, une maladie du bois qui menace la pérennité des vignobles non seulement en France mais aussi au niveau mondial, et pour laquelle il n'existe aucun moyen de lutte chimique ou autre.

Le manuscrit de thèse est constitué de la façon suivante : après une revue de l'état de l'art sur le sujet décrit ci-avant, les objectifs et les démarches entreprises seront décrits. Puis les principales expérimentations et résultats obtenus seront présentés et discutés. Le texte se terminera par une partie dédiée à une discussion générale et aux perspectives que ce travail permettra.

# 1

## Chapitre

# Introduction générale

## 1- La viticulture

### 1.1 Histoire de la vigne

La vigne est une plante qui a une histoire singulière car elle est, non seulement, une des principales cultures horticoles mondiales, mais elle a aussi des liens historiques anciens avec le développement de la culture humaine (This *et al.* 2006). Son principal produit, le vin, était considéré comme « divin », Dionysos et Bacchus ayant été consacrés à cette boisson des dieux. Le vin a également un rôle très important dans les religions monothéistes judéo-chrétiennes où il est souvent associé à une purification des fautes commises par l'être humain. Le vin a en fait toujours eu un rôle majeur dans le mode de vie des peuples de la Méditerranée (Blanco 1997).

Cette plante pérenne Angiosperme appartient à l'ordre des *Rhammales* et à la famille des *Vitacées* qui regroupe 14 genres différents (tableau 1). Il se divise en 2 sous-groupes : (1) le *Muscadina* (2n=40 chromosomes) limité au sud-est des États-Unis, au nord-est du Mexique, Belize, Guatemala et aux Caraïbes et (2) le groupe *Vitis* (2n=38), prédominant en agronomie, qui est largement distribué en Europe, en Asie et en Amérique (Zecca *et al.* 2012). Les vignes européennes appartiennent à une seule espèce, *Vitis vinifera*, qui est la plus utilisée pour produire du vin. Elle comprend deux formes : la vigne cultivée, *Vitis vinifera sativa*, et la vigne sauvage, *Vitis vinifera sylvestris* (This *et al.* 2006). Cependant, cette dernière a quasiment disparu suite aux attaques de bioagresseurs,

principalement le mildiou et le phylloxéra, aux déforestations et aux réaménagements territoriaux.

Tableau 1 Diversité de la famille des *Vitacées* (d'après la thèse de Dufour 2011)

Genre	Nombre d'espèces
<i>Vitis</i>	108 (dont 28 fossiles, 15 douteuses)
<i>Cissus</i>	367 (dont 8 fossiles)
<i>Ampelopsis</i>	31 (dont 4 fossiles)
<i>Pterisanthes</i>	21
<i>Tetrastigma</i>	132 (dont 4 fossiles)
<i>Ampelocissus</i>	92
<i>Clematicissus</i>	1
<i>Parthenocissus-Landukia-Yua</i>	19/01/03
<i>Rhoicissus</i>	11
<i>Cayratia</i>	65 (dont 1 fossile)
<i>Acareosperma</i>	1
<i>Pterocissus</i>	1
<i>Cyphostemma</i>	258
<i>Nothocissus</i>	1

Dans la littérature, l'origine de la domestication et de la culture de la vigne sont généralement situées entre le VII<sup>ième</sup> et le IV<sup>ième</sup> millénaire avant Jésus-Christ (J.-C.), dans une zone géographique située entre la mer Noire et l'Iran (Terral *et al.* 2010). La vigne s'est progressivement répandue, par exemple en Grèce et en Crète (Valamoti *et al.* 2007) vers le VI<sup>ième</sup> millénaire avant J.-C., en Italie au IX<sup>ième</sup> siècle avant J.-C., puis en Espagne et au Maghreb vers le dernier millénaire avant J.-C.

L'émergence de la viticulture en France serait concomitante avec la fondation de la ville de Marseille 600 ans avant J.-C. par les Phocéens grecs (Brun et Laubenheimer 2001). Elle s'est vraisemblablement rapidement répandue dans le sud de la France à partir du V<sup>ième</sup> siècle avant J.-C. Après la conquête romaine, la viticulture était bien établie dans la région du Languedoc, atteignant son apogée entre la fin du I<sup>er</sup> siècle et le II<sup>ième</sup> siècle après J.-C. Par la route «Narbonnaise», la viticulture s'est développée en Aquitaine durant le premier siècle de notre ère. Aujourd'hui plus de 200 cultivars de *Vitis vinifera* seraient cultivés, les plus couramment utilisés sont : le Cabernet Sauvignon, le Cabernet Franc, le Merlot, le Pinot noir ou encore l'Ugni blanc.

## 1.2 La filière viticole en quelques chiffres

Aujourd'hui, 7,5 millions d'hectares de vignes sont cultivés dans le monde et 27 millions de tonnes de vin sont produits par an (FAOSTAT 2011, chiffres estimés sur 2009), plaçant la filière viticole parmi les plus importantes au niveau économique (Compant *et al.* 2012).

Avec 44 millions d'hectolitres (Mhl) produits, la France est le premier producteur mondial (16% de la production mondiale) devant l'Italie (42 Mhl) et l'Espagne (35 Mhl) (OIV 2012). La viticulture génère 558 000 emplois directs ou indirects (17 régions françaises sur 22 sont productrices de vin), elle est le 1<sup>er</sup> secteur agroalimentaire excédentaire et le 2<sup>ème</sup> secteur excédentaire, après l'aéronautique. La valeur des exportations est estimée à 7,6 milliards d'euros pour les vins en 2012 (Fédération des Exportateurs de Vins et Spiritueux,

[www.fevs.com](http://www.fevs.com)).

Dans le bassin Aquitain, la viticulture occupe une place centrale au niveau économique. Le vignoble Bordelais s'étend sur quelques 115 000 ha, il est le troisième département viticole français en terme de production globale, mais le premier en terme de volume produit pour les vins d'Appellations d'Origine Contrôlées AOC, 63 vins). Les cépages dominants du Bordelais sont pour les vins rouges, le Cabernet Sauvignon, le Merlot et le

### Encart 1. Cultivar/Cépage

**Cultivar** : un cultivar est une variété de plante obtenue en culture, généralement par sélection, pour ses caractéristiques « réputées uniques ». Il peut s'agir de qualités esthétiques, techniques, d'adaptation à un biotope ou de résistance à certaines maladies.

**Cépage** : un cépage, dans le langage courant, est un type de plant de vigne caractérisé par des particularités qui s'expriment au point de vue physique ; la forme des feuilles et des grappes, la couleur des raisins à maturité, etc. Au niveau botanique les cépages sont des cultivars.

Cabernet Franc, pour les vins blancs, le Sémillon et le Sauvignon.

## 1.3 Maladies de la vigne et agents pathogènes

Les ceps de vigne peuvent être infectés et colonisés par une grande variété de bioagresseurs (tableau 2) de natures diverses tels que des champignons, des oomycètes des bactéries mais également des insectes, des acariens et des virus. Ils peuvent avoir des effets très importants sur le développement des plantes hôtes, des baies, mais aussi sur la qualité du vin (Gouadec *et al.* 2007) entraînant des pertes économiques pour les viticulteurs et les producteurs (Van Helden 2008).

Tableau 2 Les principales maladies de la vigne (d'après la thèse de Dufour 2011)

Classe	Maladies	Agents pathogènes	
Maladies cryptogamiques	Esca	<i>Phaeoconiella chlamydospora</i> <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> <i>Fomitiporia mediterranea</i>	
	Dépérissements à <i>Botryosphaeria</i>	<i>Botryosphaeria</i> spp	
	Eutypiose	<i>Eutypa lata</i>	
	Black-rot	<i>Guirgnardia bidwellii</i>	
	Brenner	<i>Pseudopezicula tracheiphila</i>	
	Excoriose	<i>Phomopsis viticola</i>	
	Oïdium	<i>Erysiphe necator</i>	
	Mildiou	<i>Plasmopara viticola</i>	
	Pourriture grise	<i>Botrytis cinerea</i>	
	Insectes	Phylloxera	<i>Daktulosphaira vitifoliae</i>
Cicadelles		<i>Scaphoïdeus titanus</i> (Ball) <i>Empoasca vitis</i> <i>Metcalfa pruinosa</i>	
Vers de la grappe		<i>Lobesia botrana</i> (Eudémis) <i>Eupoecilia ambiguella</i> (Cochylis) <i>Sparganothis pilleriana</i> (pyrale)	
Acariens		Acariens rouges	<i>Panonychus ulmi</i> (Koch)
		Acariens jaunes	<i>Eotetranychus carpini</i> (Oudemans)
	Erinose	<i>Calipitrimerus vitis</i>	
Virus, bactéries et insectes vecteurs	Acariose	<i>Eriophyes vitis</i>	
	Court-noué	GFLV (Grapevine Fan Leaf Virus) et <i>Xiphinema index</i> ArMV (Arabic Mosaic Virus) et <i>Xiphinema diversicaudatum</i>	
	Bois noir	<i>Phytoplasma</i> spp. et <i>Hyalesthes obsoletus</i>	
	Enroulement	GRLaV (Grapevine leafroll-associated virus)	
	Flavescence dorée	<i>Phytoplasma</i> spp. et <i>Scaphoïdeus titanus</i> (Ball)	
	Maladie de Pierce	<i>Xylella fastidiosa</i> et <i>Homalodisca</i> spp.	

Certaines maladies mettent en danger la récolte de l'année, *i.e.* le mildiou, l'oïdium, tandis que d'autres conduisent aux dépérissements des ceps et remettent en cause la pérennité du vignoble, *i.e.* l'esca et l'eutypiose. A noter que *Scaphoïdeus titanus*, le vecteur de la flavescence dorée, est déclaré comme étant une maladie de quarantaine depuis 1993 par l'Union Européenne (Chuche 2010).

Les principales maladies épidémiques sont le mildiou, l'oïdium et la pourriture grise, mais les maladies du bois sont de plus en plus préoccupantes. Connues depuis des siècles comme atteignant des ceps généralement âgés et n'induisant que des dégâts négligeables, elles sont devenues ces vingt dernières années l'objet de préoccupations majeures pour la filière viti-vinicole (Bertsch *et al.* 2013 ; Mugnai *et al.* 1999).

Dans le cadre des présents travaux de thèse, les expérimentations ont été principalement réalisées sur les maladies du bois, et plus précisément l'esca.

## **1.4 Les maladies du bois de la vigne**

Les maladies du bois (MDB) provoquent des dépérissements des ceps de vigne, la longévité des vignobles est alors affectée ainsi que la qualité de la récolte (Lorrain *et al.* 2012) ; les plus significatives sont l'eutypiose, l'esca et les dépérissements à *Botryosphaeria* (Bertsch *et al.* 2013).

### **1.4.1 L'impact des MDB sur la filière viti-vinicole**

Un observatoire national des maladies du bois a été mis en place en France en 2003 afin d'évaluer l'étendue et l'évolution des MDB dans 11 régions viticoles ([agriculture.gouv.fr](http://agriculture.gouv.fr), bulletin officiel du 26 mai 2003). Les résultats du suivi entre 2003 et 2008 ont été récemment publiés par Grosman et Doublet (2012) et Bruez *et al.* (2013). Ils montrent la prépondérance de l'esca comparativement à l'eutypiose.

Tous les cépages, de toutes les régions viticoles françaises, sont concernés, même si des différences notables sont observées (Bruez *et al.* 2013 ; Grosman et Doublet 2012). Par exemple, le cépage Ugni Blanc est très sensible à l'eutypiose (constaté en Charentes) alors que le Savagnin et le Trousseau (constaté dans le Jura) le sont par rapport à l'esca. De plus, selon les régions, un même cépage peut-être atteint dans des proportions identiques par l'esca, *e.g.* le Sauvignon dans les vignobles de Bordeaux, de Bourgogne et du Centre,

ou de façon différente, e.g. le Cabernet Sauvignon dans le Bordelais et en région Provence-Alpes Côte d'Azur.

Des observations préliminaires indiqueraient également qu'il existe, à l'intérieur d'un cépage, des clones dont la sensibilité à l'esca est supérieure à la sensibilité globale de la variété (Cordier, communication personnelle). Il est important de mentionner que si l'esca était habituellement présent chez des vignes âgées de 15 à 25 ans, de jeunes vignes sont maintenant de plus en plus atteintes (Kobès 2006 ; Romanazzi *et al.* 2009).

Le pourcentage de ceps atteints par l'esca diffère selon les régions viticoles, en 2008, il était de 6 % dans le Bordelais, de 8% en Charentes et d'environ 10 % dans le Jura. Ces variations peuvent s'expliquer par les différences de climats, de sols et de cépages (Lecomte *et al.* 2012 ; Surico *et al.* 2006). Une hypothèse avancée par la communauté scientifique est que les changements climatiques favorisent l'expression des symptômes foliaires.

Le développement constant depuis environ 20 ans des MDB induit des pertes économiques conséquentes. Grosman et Doublet (2012) rapportent que si l'on inclut les pertes indirectes, c'est-à-dire les plants qui ont été arrachés et/ou replantés (ils ne produisent pas de baies de qualité avant 3 années), les ceps morts, ceux recépés, etc... Environ 11% du vignoble français était improductif en France en 2008, et 13% en 2012. En Aquitaine ce chiffre est plus élevé puisqu'il se situait autour de 14% en 2008 (Bruez *et al.* 2013).

Si le constat au sujet des MDB est préoccupant en France, il l'est aussi dans la majorité des vignobles européens et mondiaux. En Espagne, en moyenne 3% des ceps seraient affectés par les MDB, mais dans certaines parcelles, plus de 30% des ceps seraient atteints (J. Armengol, communication personnelle). Au Portugal, ces maladies sont répandues dans toutes les régions viticoles et 5% des ceps seraient atteints (C. Rego, communication personnelle). Ce même chiffre est atteint en Allemagne, dans les régions du Baden et du Palatinat et il aurait tendance à augmenter ces dernières années (M. Fischer, communication personnelle). En Italie, l'incidence annuelle varie de 3-4% à plus de 30%, et dans certaines parcelles, l'incidence cumulée sur une période de 6 années serait de 70% (L. Mugnai et S. Di Marco, communication personnelle).

Au niveau de la nuisibilité économique des MDB, les références sont peu nombreuses ou imprécises. Les données chiffrées disponibles révèlent cependant l'ampleur des pertes liées aux MDB. Par exemple, dans le Loir-et-Cher, l'impact économique de l'esca serait de 5 à 6 millions d'euros de pertes par an. En Australie, Wicks et Davies (1999) ont estimé les pertes de rendement dues à l'eutypiose à 860 et 740 kg/ha pour les cépages

Shiraz et Cabernet Sauvignon respectivement. Pour le Shiraz, cela équivalait à une perte de 20 millions de dollars australiens et en Californie, Siebert (2001) estime qu'elles s'élèvent à 260 millions de dollars par an pour l'eutypiose. Hofstetter *et al.* (2012) ont calculé que le remplacement de 1% des ceps représente un coût de 1,132 milliard d'euros au niveau mondial, une estimation qui est très certainement très en dessous de la réalité.

#### 1.4.2 L'esca

Cette pathologie est la plus ancienne des maladies décrites chez la vigne.

##### Encart 2. Postulat de Koch

Le postulat de Koch, en pathologie, permet d'établir le lien entre un agent pathogène et une maladie. Ce postulat a été publié par Koch en 1890 :

1. Le micro-organisme doit être présent en abondance dans tous les organismes souffrant de la maladie mais absent des organismes sains.
2. Le micro-organisme doit pouvoir être isolé de l'organisme malade et cultivé *in vitro*.
3. Le micro-organisme cultivé doit entraîner l'apparition de la maladie lorsqu'il est introduit dans un organisme sain.
4. Le micro-organisme doit être à nouveau isolé du nouvel organisme hôte rendu malade, puis identifié comme étant identique à l'agent infectieux original.

Connue des grecs et des romains, elle doit son nom à la présence de pourriture blanche aussi appelée amadou dans le tronc (Amadou en langue d'Oc signifiant esca) (Viala 1926).

Malgré son origine lointaine, les causes exactes ne sont pas encore complètement élucidées et l'étiologie de la maladie apparaît comme étant complexe. Contrairement à l'eutypiose, où l'agent responsable (*Eutypa lata*) a été identifié et dont les relations avec la plante sont relativement connues, les agents pathogènes impliqués dans l'esca ne sont sans doute pas tous identifiés. Ainsi, suite à l'inoculation des champignons possiblement responsables de l'esca, les symptômes nécrotiques dans le bois sont reproduits, mais ceux atteignant les feuilles sont rarement observés ; le postulat de Koch n'est donc que partiellement vérifié (Laveau *et al.* 2009 ; Sparapano *et al.* 2000).



Photographie 1 Symptômes d'esca observés au vignoble sur cépage « rouge ». (c) Cep présentant sur le bras gauche la forme lente de l'esca et sur le bras droit la forme apoplectique. Après écorçage une lésion brune orangée est visible, (a) et (b) symptômes foliaires (photos de Lecomte).

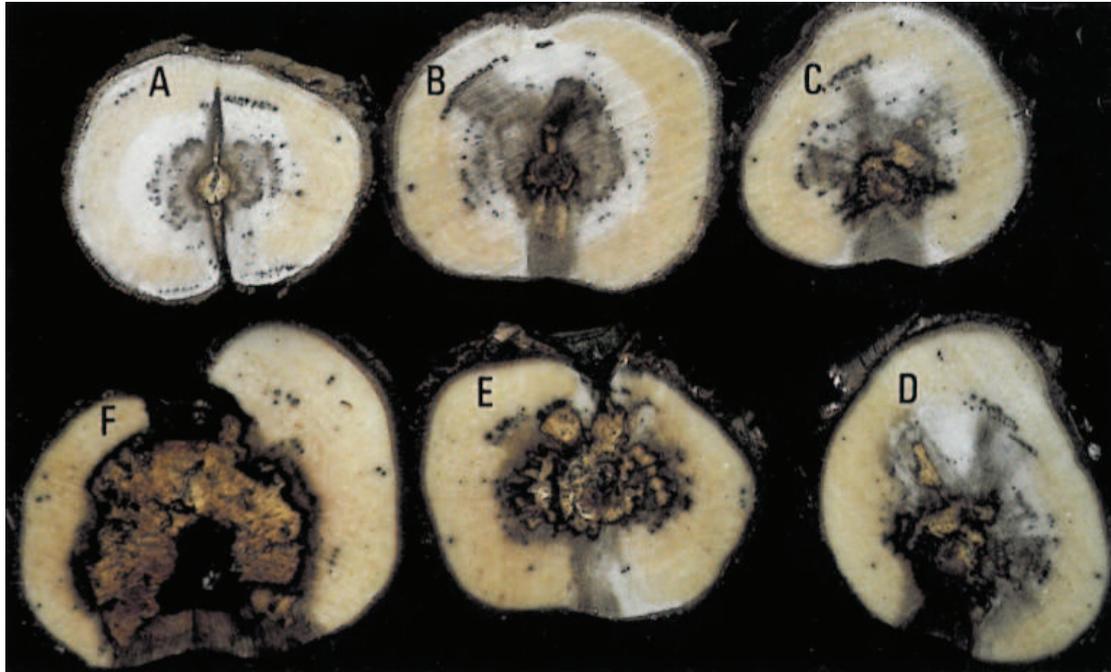
La maladie de l'esca se présente principalement sous deux formes (figure 1) : celle dite lente et celle dite foudroyante ou apoplectique. Les symptômes foliaires associés à la forme lente (Arnaud et Arnaud 1931; Chiarappa 1959; Larignon et Dubos 1997; Viala 1926) se caractérisent par des décolorations foliaires spécifiques: les tâches internervaires sont jaunâtres chez les cépages blancs et elles sont bordées de rouges chez les cépages noirs, les nervures restant vertes. Ces tâches évoluent progressivement vers un brunissement et un dessèchement. Les symptômes foliaires peuvent être visibles une année sur un cep et disparaître l'année suivante (Maher *et al.* 2012). Cette manifestation des symptômes foliaires n'est cependant pas sans conséquences sur la durée de vie du cep. L. Guérin-Dubrana (communication personnelle) a récemment indiqué que l'expression des symptômes pendant 2 années durant une période de 4 ans était associée avec un risque significatif de mort des ceps. La forme dite apoplectique se manifeste par un dessèchement des organes aériens, rameaux, feuilles et grappes, d'une partie ou de la totalité du cep de vigne en l'espace de quelques heures ou en quelques jours. Ces symptômes apparaissent consécutivement à une pluie d'orage ou à un excès d'eau dans le sol associés à des températures élevées et à un vent chaud sans symptômes foliaires annonciateurs. Ces conditions climatiques engendreraient chez le végétal un déséquilibre entre l'absorption et la transpiration, ce qui serait parfois fatal chez les vignes atteintes par l'esca (Surico *et al.* 2006). Pour Luini *et al.* (2010), les symptômes foliaires seraient la visualisation d'une action des toxines émises par les champignons présents dans le bois et véhiculées jusqu'aux organes herbacés par les vaisseaux conducteurs.

Il est aujourd'hui admis que deux processus conduisent à une dégradation du bois (figure 2) caractéristique de l'esca en France (Larignon et Dubos 1997).

Le premier processus de dégradation conduit à la formation d'une nécrose centrale. Trois espèces fongiques seraient impliquées dans ce processus séquentiel: *Phaeomoniella chlamydospora* (Crous et Gams 2000) pénétrerait d'abord par les plaies de taille et formerait des ponctuations noires (Larignon 2004). Puis *Phaeoacremonium aleophilum* (Gams *et al.* 1996) formerait une nécrose de couleur brun - rose qui en se joignant progressivement aux ponctuations noires donnerait une nécrose brune et dure. Enfin, *Fomitiporia mediterranea* (Fischer 2002), colonise la nécrose en position centrale et la dégrade en une pourriture blanche, claire et tendre (amadou). Selon Larignon (2004) si l'un des deux champignons pionniers (*P. aleophilum* et *P. chlamydospora*) ne colonise pas les tissus, le processus de dégradation échoue.

Le second processus fait intervenir deux espèces fongiques responsables de nécroses sectorielles : *Eutypa lata* qui serait à l'origine d'une nécrose brune, celle - ci étant

par la suite colonisée par *Fomitiporia mediterranea*. L'action combinée des deux champignons aboutit à la formation d'une nécrose claire et tendre, l'amadou.



Photographie 2 Sections de troncs de San Giovese de 25 ans affectés par l'esca, partant de segments jeunes (A à C) vers la base du tronc (D à F). (photos de P. Larignon, 1991)

La présence de nécroses importantes dans le bois n'est pas systématiquement associée à l'expression de symptômes foliaires, elle est cependant corrélée positivement à la mortalité des ceps et à leur état de dégradation avancée (Limiñana *et al.* 2009). Les baies des ceps atteints de l'esca présentent généralement un aspect sain mais peuvent subir un retard dans la maturation, ou alors flétrir et se momifier (Larignon 2005). Des tâches bleuâtres à noires peuvent apparaître sur les baies en l'absence de symptômes foliaires ; il s'agit du faciès « black - measles » qui est principalement observé en Italie (Mugnai *et al.* 1999) et en Californie (Dubos 2002).

Les propriétés des 3 principaux champignons associés à l'esca : *P. chlamydospora* (Crous et Gams 2000), *P. aleophilum* (Crous *et al.* 1996), et *F. mediterranea* (Fischer 2002) sont décrites ci-après

- *Phaeomoniella chlamydospora*

Ce micro-organisme est un ascomycète de l'ordre des *Chaetothyriales* et de la famille des *Herpotrichiellaceae* dont la forme sexuée n'est pas connue (Dubos 2002). Il est isolé dans les nécroses brunes et dures, dans les tissus ceinturant la pourriture blanche et au niveau des ponctuations noires, situées à la périphérie des nécroses. Il se caractérise par des colonies de couleur vert clair à vert foncé, des conidiophores renflés à leur base et pigmentés. Les conidies sont de forme oblongue à ellipsoïdale, droites et subhyalines. Cet ascomycète est un champignon à dissémination aérienne qui pénètre dans le bois par les plaies de taille pendant la période hivernale, lors de périodes douces et pluvieuses. Il se développe à des températures comprises entre 10°C et 35°C avec un optimum de 25-30°C (Larignon 2005). Sa principale source d'inoculum, sous forme de pycnides, est localisée sur les plaies de tailles âgées, dans des zones protégées (craquelures dans le bois) ou encore sous l'écorce dans les zones où les vaisseaux sont exposés suite à des blessures (Eskalen et Gubler 2001). Les spores germent et le mycélium colonise les vaisseaux du bois. Chaque année, la plante peut être contaminée de nouveau, ce phénomène se traduit par l'apparition de ponctuations noires au niveau des derniers cernes (Larignon 2004).

La propagation de cet ascomycète dans les tissus ligneux peut se faire via le mycélium issu des pycnides qui colonise la plante à partir de blessures ou la sève qui véhicule les pycniospores des racines aux rameaux (Bertelli *et al.* 1998 ; Feliciano et Gubler 2001). Selon Aroca *et al.* (2008) *P. chlamydospora* est présent dans les rameaux en tant qu'endophyte, il est par exemple isolé des plants en pépinières (Bertelli *et al.* 1998 ; Gimenez-Jaime *et al.* 2006). En effet durant le processus d'élaboration des plants, lors de la phase de réhydratation avant greffage, les taux d'infection par *P. chlamydospora* augmentent (Whiteman *et al.* 2004). Il faut noter que *P. chlamydospora* est naturellement présent dans le sol, cependant aucune preuve de la relation entre sa présence dans le sol et dans les plantes n'a été montrée (Damm et Fourie 2005 ; Gubler *et al.* 2004 ; Retief *et al.* 2006 ; Whiteman *et al.* 2005).

Au niveau génétique, les populations de *P. chlamydospora* sont faiblement variables (Comont *et al.* 2010 ; Péros *et al.* 2000 ; Tegli *et al.* 2000 ; Tello *et al.* 2010). Ces micro-organismes produisent différents types de molécules, des phytotoxines (Tabacchi *et al.* 2000), des polysaccharides extracellulaires (Sparapano *et al.* 2000) ainsi que des enzymes, *i.e.* polygalacturonases, polyméthylgalacturodases,  $\beta$ -glucosidases et des endo- $\beta$ -1,4 glucanases (Marchi *et al.* 2001 ; Mugnai *et al.* 1999) qui leurs confèrent une certaine virulence vis à vis des végétaux.

- *Phaeoacremonium aleophilum*

*Phaeoacremonium aleophilum* (anamorphe *Togninia minima*) forme à partir de la moelle une nécrose de couleur brun-rose qui se mélange avec les ponctuations noires dues à *P. chlamydospora* pour former les nécroses de l'esca. Contrairement à *P. chlamydospora*, *P. aleophilum* a la capacité de passer d'un cerne à l'autre (Larignon 1991). Cet ascomycète est classé dans la famille des *Togniniaceae* appartenant à l'ordre des *Diaporthales* (Mostert *et al.* 2003). Il se caractérise sur milieu synthétique par des colonies de couleur gris-beige à gris olive. Les conidies sont de forme oblongue, ellipsoïdale et droite. Ce micro-organisme produit des enzymes, *i.e.* xylanases,  $\beta$ -glucosidases, endo- $\beta$ -1,4 glucanases (Mugnai *et al.* 1999) mais aussi des molécules cytotoxiques de type naphthalénones (Abou-Mansour *et al.* 2004 ; Evidente *et al.* 2000).

La source d'inoculum (sous forme mycélienne) est située sur le tronc ou les bras excoriés ou encore dans les crevasses et les craquelures des ceps (Rooney-Latham *et al.* 2005). Les contaminations ont lieu via les plaies de taille durant la période végétative de la vigne (Larignon *et al.* 2000). De même que pour *P. chlamydospora*, *P. aleophilum* est présent chez les jeunes plants greffés transplantés au champ (Larignon *et al.* 2006).

Il est intéressant de noter que *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* sont également associés à une autre maladie du bois, la maladie de Pétri, qui affecte les jeunes vignes (âgées de 1 à 10 ans) et qui se manifeste par des chloroses et des nécroses sur les feuilles (Del Rio Conesa 2002 ; Fourie et Halleen 2002). Toutefois, cette maladie ne semble pas se manifester en France (Dubos 2002).

- *Fomitiporia mediterranea*

Anciennement appelé *Phellinus punctatus* (Walla, 1984) puis *Fomitiporia punctata* (Cortesi *et al.* 2000), il est responsable de la formation d'une pourriture blanche, appelée amadou, qui est le dernier stade de dégradation des tissus ligneux (Larignon et Dubos 1997). Ce basidiomycète appartient à l'ordre des *Hyménochaetales* et à la famille des *Hymenochaetaceae*. Il dégrade le bois prenant la suite d'autres micro-organismes responsable des nécroses sectorielles (*E. lata*), et centrale (*P. chlamydospora* et *P. aleophilum*) à l'intérieur des ceps de vigne. Il est considéré comme un colonisateur secondaire ayant un important pouvoir de dégradation des parois cellulaires; il produit les mêmes enzymes que *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* mais aussi des enzymes lignolytiques, *i.e.* laccases, peroxydases et phenoloxydases (Bruno et Sparapano 2006 ; Mugnai *et al.* 1999). Très peu d'études ont été réalisées sur le cycle biologique de ce champignon qui est mal connu. Il se conserve dans les parties malades de la plante sous forme de carpophores, il se dissémine via les spores issues des basidiospores par voie

aérienne (Bertsch *et al.* 2013). Contrairement à *P. aleophilum* et *P. chlamydospora*, *F. mediterranea* n'est pas retrouvé en pépinière (Larignon *et al.* 2008).

#### **1.4.5 La lutte contre l'esca**

Au niveau de la protection des ceps de vigne, certaines maladies comme l'oïdium, le mildiou ou la pourriture grise, sont traitées avec des produits phytosanitaires pour lesquels un large choix de molécules est disponible. Il existe par exemple 58 fongicides ayant 8 modes d'action différents sur le mildiou (Corio-Costet 2012). L'objectif de la filière viticole est de contrôler ces maladies tout en réduisant fortement le nombre de traitements phytosanitaires. A l'inverse, pour les maladies du bois, aucun produit phytosanitaire n'est autorisé en France (Bertsch *et al.* 2013). Depuis le retrait en 2001 du seul produit homologué contre l'esca, l'arsénite de sodium, en raison de sa forte toxicité sur l'environnement et de ses effets cancérigènes sur l'Homme, de nombreuses méthodes de protection ont été testées sans réel succès (Bertsch *et al.* 2013).

##### *- L'utilisation de pesticides de synthèse chimiques:*

Les fongicides chimiques ont été évalués, soit en traitement foliaire par pulvérisation, soit en injection dans le tronc ou en badigeon ou pulvérisation sur les plaies de tailles car elles représentent des voies de pénétration pour les agents pathogènes. Un produit de la famille des benzimidazoles (carbendazime) et un second des carbamates (bénomyl) ont montré une efficacité contre les agents pathogènes impliqués dans l'eutypiose et l'esca (Bertsch *et al.* 2013 ; Bester *et al.* 2007 ; Gramaje et Armengol 2011 ; Sosnowski *et al.* 2008). Cependant ces deux matières actives sont interdites à cause de leur toxicité sur la santé (effet cancérigène) et l'environnement (Bertsch *et al.* 2013 ; Fourie et Halleen 2006 ; Halleen et Fourie 2005 ; Pitt *et al.* 2010 ; Rolshausen *et al.* 2010 ; Sosnowski *et al.* 2008). Concernant les applications en pépinière, le benomyl, le carbendazime, le chlorure de didécylidiméthylammonium (Sporekill, ICA International Chemicals Pty.Ltd., Stellenbosch, South Africa; 150 ml per 100 l water) ou encore le captane, ont un effet sur *P. chlamydospora* et les *Phaeoacremonium* spp. (Fourie et Halleen 2004, 2006). Vignes *et al.* (2010) ont montré que l'association de deux matières actives, le cypronidil et le fludioxonil d'une part ou le pyradostrobine et le métirame d'autre part, permettait de réduire l'inoculum de chacun des micro-organismes suivant : *Cylindrocarpon* spp., *Botryosphaeria* spp. et *P. chlamydospora*.

Malgré l'obtention d'effets intéressants, ces approches sont globalement longues, coûteuses, difficiles à appliquer et particulièrement sensibles au lessivage par la pluie

(Calzarano *et al.* 2004 ; Rolshausen et Gubler, 2005 ; Sosnowski *et al.* 2004). De plus, l'efficacité est variable et diffère selon les espèces fongiques (Amponsah *et al.* 2012 ; Bester *et al.* 2007; Rolshausen *et al.* 2010). Pour ces différentes raisons, d'autres stratégies ont été développées afin de limiter l'incidence des maladies du bois.

- *Les méthodes alternatives et/ou prophylactiques :*

Parmi les méthodes prophylactiques, il est préconisé de pratiquer la double taille ou la taille préventive (Weber *et al.* 2007), de réaliser une taille tardive pour réduire la période où une contamination est possible et d'éliminer les bois morts de la parcelle (Di Marco *et al.* 2000 ; Lecomte *et al.* 2004). Geoffrion et Renaudin (2002) ont montré que le système de taille en Guyot-Poussart (cette méthode permet de localiser les plaies de taille sur la partie supérieure des bras ce qui favorise les trajets de sève sur la face inférieure et ainsi la végétation, [www.vignevin-sudouest.com](http://www.vignevin-sudouest.com)) limite le développement de l'esca car il permet de conserver des trajets de sève indemnes à l'opposé des plaies de taille.

Une autre approche, développée dans cette thèse, consiste à utiliser des micro-organismes afin de réaliser une lutte biologique (ou biocontrôle) contre cette maladie. Ce point sera abordé dans la partie ci-dessous (2-le biocontrôle par utilisation de micro-organismes).

Parmi les stratégies pour faire face aux différentes maladies qui touchent la vigne et plus globalement aux végétaux, il est possible de citer : la sélection de variétés résistantes aux bioagresseurs (Eibach *et al.* 2007 ; Lammerts Van Bueren *et al.* 2011), la transgénèse (Collinge *et al.* 2010 ; Domingo *et al.* 2011), la prophylaxie (Alabouvette *et al.* 2006), la lutte chimique ou encore la lutte biologique. Cette dernière méthode nous intéresse plus particulièrement. Elle bénéficie en effet d'un d'intérêt soutenu depuis plusieurs années et présente des perspectives particulièrement intéressantes au vu du défi majeur de l'agriculture : produire des aliments de qualité tout en ayant un faible impact environnemental.

## 2- Le biocontrôle par utilisation de micro-organismes

Les pesticides de synthèse chimiques utilisés depuis de nombreuses années pour lutter contre les agents pathogènes de plantes sont aujourd'hui l'objet de nombreuses critiques en raison des effets néfastes qu'ils exercent sur l'environnement, les aliments et, au final, sur les consommateurs. Cette prise de conscience et la volonté politique en matière de réduction des risques associés à une utilisation très forte, parfois abusive, de produits chimiques font que le développement rapide de nouvelles méthodes de protection des végétaux respectueuses de l'environnement est plus que jamais d'actualité. « L'âge d'or » des pesticides chimiques semble donc révolu et la mise au point de méthodes alternatives de lutte, comme la lutte biologique (ou biocontrôle) à l'aide de micro-organismes, suscite un intérêt grandissant.

En Europe, seuls 14 genres microbiens (champignons, oomycètes et bactéries) sont actuellement inscrits au règlement européen n°1107/2009.

### 2.1 Les agents de biocontrôle utilisés contre les maladies de la vigne

Les micro-organismes utilisés en lutte biologique sont principalement des champignons, des oomycètes, des bactéries. Les modes d'action peuvent être différents et multiples. Deux termes sont parfois rencontrés dans la littérature pour nommer ces derniers :

- Celui de BCA, pour « BioControl Agent », est utilisé dans le cas où son action est directe sur l'agent pathogène (Avis *et al.* 2008).
- Lorsque le micro-organisme a une action sur la plante, le terme de PGPM pour « Plant Growth Promoting Microorganism » est employé; il se décline en PGP-F (Fungi) pour les champignons, PGP-Y (Yeast) pour les levures, PGP-B pour les bactéries et PGP-R pour les rhizobactéries.

Néanmoins, comme évoqué précédemment, les agents de biocontrôle sont généralement PGPM et BCA en même temps, *i.e.* *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp., *P. oligandrum* (Benhamou *et al.* 2012 ; Hermosa *et al.* 2012 ; Santoyo *et al.* 2012). Les principaux agents de biocontrôle des maladies de la vigne sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3 Les principaux agents de biocontrôle rapportés dans la littérature scientifique pour protéger la vigne

Maladie	Phytopathogène	Agent de Biocontrôle	References
Mildiou	Plasmopara viticola (Berk, and Curt.) Berl. and de Toni	<i>Alternaria alternata</i>	Pertot et al. (2007), Musetti et al (2006)
		<i>Epicoccum nigrum</i>	Koterkamp (1997)
		<i>Epicoccum sp.</i>	Fowler et al. (1999)
		<i>Fusarium proliferatum</i> G6 et 1505	Falk et al. (1996), Bakshi et al. (2001)
		<i>Penicillium chrysogenum</i>	Thuerig et al. (2006)
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Tilcher et al. (2002)
		<i>Pseudomonas syringes</i>	Kassenmeyer et Busam (1998)
		<i>Scytalidium sp.</i>	Fowler et al. (1999)
		<i>Serratia marcescens</i> MSU-97	Strobel et al. (2005)
		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Tilcher et al. (2002)
		<i>Streptomyces sp.</i> ANK313	Abdalla et al. (2011)
		<i>Trichoderma harzianum</i> T39	Perazzolli et al. (2008, 2011)
		<i>Ulocladium sp.</i>	Fowler et al. (1999)
Oïdium	Erysiphe necator Schw.	<i>Verticillium lecanii</i>	Heintz et Blaich (1990)
		<i>Tilletiopsis pallenscens, minor, washingtonensis</i>	Haggag et al. (2007)
		<i>Pseudozyma flocculosa</i>	Schmitt et al. (2001), Konstantinidou-Doltsinis et al. (2007)
		<i>Pseudomonas syringes</i>	Kassenmeyer et Busam (1998)
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> pf1	Sendhivel et al. (2007)
		<i>Penicillium chrysogenum</i>	Thuerig et al. (2006)
		Levure (Y16)	David et al. (2007)
		<i>Brevibacillus brevis</i>	Schmitt et al. (2001)
		Bactéries et levures en mélange	Robotic et al. (2002)
		Bactéries (B71, B69, B19, B6, F77 USB1, USB20) et levures (Y89, 16, 13, S2), <i>Ampelomyces quisqualis</i> AQ10	Angeli et al. (2006, 2007)
		<i>Bacillus subtilis</i> QST-713 (Serenade)	Marrone (2002)
		<i>Bacillus subtilis</i>	Crisp et al. (2006)
		<i>Bacillus strains</i> ATCC 55608 and 55609	Sawant et al. (2011)
		<i>Bacillus pumilus</i> B-30087	Lehman et al. (2000)
		<i>Ampelomyces quisqualis</i> G5 et G273	Falk et al. (1995a,b)
		<i>Ampelomyces quisqualis</i> AQ10	Daoust et Hofstein (1996), Monchiero et al. (1996), Zanzotto et al. (2005)
		<i>Ampelomyces</i> Q/ Qfect WP souche 94013	Lee et al. (2004)
Pourriture grise	<i>Botrytis cinerea</i> (Pers.)	<i>Acinetobacter lwoffii</i> PTA-113 and PTA-152	Magnin-Robert et al. (2007) Trotel-Aziz et al. (2006, 2008), et Verhagen et al. (2011)
		<i>Acremonium cephalosporium</i> B11	Zahavi et al. (2000)
		<i>Aureobasidium pullulans</i>	lima et al. (1996, 1997, 1999)
		<i>Aureobasidium pullulans</i> L47	Schena et al. (1999)
		<i>Aureobasidium pullulans</i> LS30	Castoria et al. (2001)
		<i>Bacillus circulans</i> GI 070	Paul et al. (1997)

Maladie	Phytopathogène	Agent de Biocontrôle	References
		Bacillus sp.	Krol (1998)
		<i>Bacillus subtilis</i>	Paul et al. (1998), Ferreira (1990), Elad et Stewart (2004)
		Bacillus subtilis PTA- 271	Trotel-Aziz et al. (2006, 2008) et Verhagen et al. (2011)
		<i>Bacillus subtilis</i> QST-713 (Serenade)	Marrone (2002)
		<i>Brevibacillus brevis</i>	Schmitt et al. (2001a)
		<i>Burkholderia phytofirmans</i> strain PsJN	Ait Barka et al. (2000,2002)
		<i>Candida</i>	Elad et Stewart (2004)
		<i>Candida famata</i> 21 D	lima et al. (1999)
		<i>Candida guilliermondii</i>	McLaughlin et al. (1992)
		<i>Candida guilliermondii</i> A42	Zahavi et al. (2000)
		<i>Candida oleophila</i>	lima et al. (1996,1997)
		<i>Candida oleophila</i> (182)	Schena et al. (2000)
		<i>Candida saitoana</i>	Schena et al. (2004)
		<i>Cryptococcus laurentii</i> LS-28	lima et al. (1999)
		<i>Debaryomyces Hansenii</i> (souche 304)	Schena et al. (2000)
		<i>Epicoccum nigrum</i>	Stewart et al (1998), Fowler et al. (1999)
		<i>Gliocladium</i>	Elad et Stewart (2004), Machowicz-Stefaniak (1998)
		<i>Gliocladium roseum</i>	Holz et Volkmann (2002)
		<i>Metschnikowia fruticola</i>	Kurtzmann et Droby (2001), Keren-zur et al. (2002)
		<i>Metschnikowia pulcherrima</i> 320	Nigro et al. (1999)
		<i>Metschnikowia spp</i> (LS 15 et 320)	Schena et al. (2000)
		<i>Micromonospora spp.</i>	Loqman et al. (2009)
		OxB related to <i>Cupriavidus</i> sp.	Schoonbeek et al. (2007)
		Pantoea agglomerans PTA-AF1 and PTA- AF2	Magnin-Robert et al. (2007), Trotel-Aziz et al. (2006, 2008), et Verhagen et al. (2011)
		<i>Pichia</i>	Elad et Stewart (2004)
		<i>Pichia guilliermondii</i> (243)	Schena et al. (2000)
		<i>Pichia guilliermondii</i> 29 A	lima et al. (1999)
		<i>Pichia membranifaciens</i> FY 101	Masih et al. (2000,2001)
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (7NSK2)	Verhagen et al. (2010)
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0, Q2-87 et WCS417	Verhagen et al. (2010)
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> PTA- 268, PTA-CT2	Magnin-Robert et al. (2007),Trotel-Aziz et al. (2006, 2008), et Verhagen et al. (2011)
		<i>Pseudomonas fluorescens strain</i>	Krol (1998)
		<i>Pseudomonas putida</i> WCS358	Verhagen et al. (2010)
		<i>Pseudozyma flocculosa</i>	Schmitt et al. (2001)
		<i>Pythium citrinum</i>	Paul (2004)
		<i>Pythium oligandrum</i>	Mohamed et al. (2007)
		<i>Pythium paroeandrum</i>	Abdelghani et al. (2004)
		<i>Pythium periplocum</i>	Paul (1999a)
		<i>Pythium radiosium</i>	Paul (1999b)

Maladie	Phytopathogène	Agent de Biocontrôle	References
		<i>Rhodotorula glutinis</i> LS-11	lima et al. (1999)
		<i>Saccharomyces chevalieri</i>	Sesan et al. (1999)
		<i>Serratia liquefaciens</i>	Whiteman et Stewart (1998)
		<i>Streptomyces</i> sp.	Lebrihi et al. (2009a, b)
		<i>Streptomyces</i> spp.	Loqman et al. (2009)
		<i>Trichoderma harzianum</i> P1	Latorre et al. (1997)
		<i>Trichoderma harzianum</i>	Holz et Volkmann (2002), Ferreira (1990)
		<i>Trichoderma harzianum</i> T39	Elad (1994, 2001), Elad et Stewart (2004)
		<i>Trichoderma viride</i>	Dubos et al. (1978)
		<i>Trichoderma viride</i> Td50	Sesan et al. (1999)
		<i>Trichosporon pullulans</i>	Holz et Volkmann (2002), Schmidt et al. (1996)
		<i>Ulocladium</i>	Elad et Stewart (2004)
		<i>Ulocladium atrum</i>	Holz et Volkmann (2002)
		<i>Ulocladium atrum</i> U385	Metz et al. (2002)
		<i>Ulocladium oudemanssii</i> HRU3	Reglinski et Kingston (2001); Elmer et al. (2003); Reglinski et al. (2005); Elmer et al. (2005)
		<i>Ulocladium</i> sp.	Fowler et al. (1999)
Eutypiose	<i>Eutypa lata</i> (Pers.) Tul. & C. Tul.	<i>Actinomycecete</i> A123	Schmidt et al. (2001)
		<i>Actinomycecete</i> isolate	Tilcher et al. (2002)
		<i>B. subtilis</i> strain Bla	Schmidt et al. (2001)
		<i>Bacillus subtilis</i> sp	Ferreira et al. (1991), Tilcher et al. (2002)
		<i>Cladosporium herbarum</i>	Rolshausen et Gubler (2005)
		<i>Trichoderma products</i> (Biotricho®, Vinevax® et echo77®)	Kotze et al. (2011)
		<i>Trichoderma harzianum</i> (Trichodex®, Trichoseal®)	John et al. (2005)
		<i>Fusarium lateritium</i>	John et al. (2005)
		<i>Trichoderma atroviride</i> USPP-T1 et USPP-T2	Kotze et al. (2011)
		<i>Bacillus subtilis</i>	Kotze et al. (2011)
		<i>Cladosporium herbarum</i>	Munkvold et Marois (1993)
		<i>Fusarium lateritium</i>	Munkvold et Marois (1993), Ho et al. (2005), John et al. (2005), McMahan et al. (2001)
		<i>Pantoea agglomerans</i> strains JII/E2 et JII/E4	Schmidt et al. (2001)
		<i>Pantoea herbicola</i>	Tilcher et al. (2002)
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Schmidt et al. (2001)
		<i>Serratia plymuthica</i>	Tilcher et al. (2002)
		<i>Serratia plymuthica</i>	Schmidt et al. (2001)
		<i>Trichoderma harzianum</i>	John et al. (2005, 2008)
Esca	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai) Crous & W.Gams	<i>Trichoderma products</i> (Biotricho®, Vinevax® et echo77®)	Kotze et al. (2011)
		<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Di Marco et al. (2004)
		<i>Trichoderma harzianum</i> T39 (trichodex)	Di Marco et al. (2002), Di marco et al. (2004)

Maladie	Phytopathogène	Agent de Biocontrôle	References
		<i>Trichoderma harzianum</i> ( <i>Trichoflow-T</i> )	Fourie et Halleen (2006)
		<i>Trichoderma harzianum</i>	Fourie et al. (2001), McLean et al. (2009)
		<i>Trichoderma atroviride</i> USPP-T1 et USPP-T2	Kotze et al. (2011)
		<i>Bacillus subtilis</i> AG1	Alfonzo et al. (2009)
		<i>Bacillus subtilis</i>	Kotze et al. (2011)
	Phaeoacremonium aleophilum W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai	<i>Bacillus subtilis</i> AG1	Alfonzo et al. (2009)
		<i>Trichoderma harzianum</i> ( <i>Trichoflow-T</i> )	Fourie et Halleen (2006)
Crown Gall	<i>Agrobacterium vitis</i>	<i>A non-tumorigenic strain (F2/5) of Agrobacterium vitis</i> <i>Agrobacterium vitis strain E26 or VAR03-1</i> <i>Bacillus sp. EN71-1</i> <i>Bacillus subtilis EN63-1</i> <i>P. fluorescens CR330D and 1100-6</i> <i>Pseudomonas aureofaciens B-4117</i> <i>Rahnella aquatilis HX2</i> <i>Strains of Enterobacter agglomerans, Rahnella aquatilis, et Pseudomonas spp.</i>	Burr et Reid (1994) et Burr et al. (1997) Kawaguchi et al. (2005, 2007) Khmel et al. (1998) Khmel et al. (1998) Khmel et al. (1998) Khmel et al. (1998) Khmel et al. (1998) Bell et al. (1995)
Maladie de Pierce	<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Xylella fastidiosa</i> Syc86-1, EB92-1, PD95-6, PD91-2, EB92-1	Hopkins (2005)
Chancre à Botryosphaeria	<i>Botryosphaeria sp</i>	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus subtilis</i> AG1 <i>Trichoderma atroviride</i> USPP-T1 et USPP-T2 <i>Trichoderma products</i> (Biotricho®, Vinevax® et echo77®)	Kotze et al. (2011) Alfonzo et al. (2009) Kotze et al. (2011) Kotze et al. (2011)
Fusarium wilt and root rot	<i>Fusarium oxysporum</i> E.F. Sm. & Swingle	<i>Pseudomonas fluorescens isolate</i> NRC10 <i>Streptomyces spp.</i>	Ziedan et El- Mohamedy (2008) Ziedan et al. (2010)
Excoriose	<i>Phomopsis viticola</i> Sacc.	<i>Trichoderma viride</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Trichoderma atroviride</i> USPP-T1 et USPP-T2 <i>Trichoderma products</i> (Biotricho®, Vinevax® et echo77®)	Dubos et al. (1978) Kotze et al. (2011) Kotze et al. (2011) Kotze et al. (2011)

Les travaux les plus nombreux concernaient les essais de lutte contre l'oïdium, le mildiou et la pourriture grise à l'aide d'agents de biocontrôle principalement de natures fongique et bactérienne. *Trichoderma* est le genre fongique le plus représenté avec 18 références, chez les bactéries *Bacillus* est le plus fréquent avec 17 références. Quelques oomycètes ont également été utilisés, *i.e.* *Pythium citrinum*, *P. oligandrum*, *Pythium periplocum*, *Pythium pareocandrum*, *Pythium radiosum* contre *Botrytis cinerea* (Abdelghani *et al.* 2004 ; Mohamed *et al.* 2007 ; Paul 1999a, 1999b, 2004).

Malgré le nombre important de travaux dans le domaine, peu de produits à base de micro-organismes sont actuellement sur le marché français. Des bactéries, *i.e.* *Pseudomonas chloraphis* et surtout *B. subtilis* comme fongicide et/ou insecticide, des champignons, *i.e.* *Beauveria bassiana*, *Benthonella tenella*, *Verticillium lecanii*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Metarhizium anisopliae* comme insecticide et *Ampelomyces quisqualis*, *T. atroviride* et *Coniothyrium minitans* comme fongicide (index phytosanitaire ACTA 2013) sont commercialisés et autorisés en France.

Concernant les maladies du bois, plusieurs études se sont intéressées aux espèces mycoparasites du genre *Trichoderma*. Ces champignons possèdent en effet une activité antagoniste vis à vis d'autres micro-organismes et peuvent induire certains mécanismes de défense des plantes (Amreen et Kumar, 2012 ; Lee *et al.* 2012 ; Tuao-Gava et Leal-Menezes 2012). Ils peuvent aussi stimuler la croissance des jeunes plants et les protéger vis à vis de stress abiotiques (Fourie et Halleen 2005).

Des expérimentations *in vitro* ont montré que des souches de *Trichoderma* inhibaient le développement de *P. chlamydospora* et *F. mediterranea*, mais pas celui de *P. aleophilum* (Larignon et Molot 2004). Fourie *et al.* (2001) ont montré lors d'un essai effectué avec de jeunes plants, un effet d'inhibition de *P. chlamydospora* et des *Phaeoacremonium spp.*

Un produit nommé Esquive, dont la matière active est le champignon *Trichoderma atroviride*, a reçu en France une homologation pour la lutte préventive contre l'eutypiose.

Une efficacité variable, voire faible, en condition de production est la principale limite à l'utilisation de ce type de produit. Ceci est généralement attribué aux compétences écologiques des agents de protection biologiques, un micro-organisme antagoniste pouvant s'adapter à un environnement donné et pas à un autre. Il faut souligner que pour les maladies du bois, d'autres méthodes alternatives de protection ont été testées : (1) la réduction du taux d'infection des plants produits en pépinière par traitement à l'eau chaude (Gramaje *et al.* 2009 ; Waite et Morton 2007). Les limites de cette méthode sont le stress qu'elle génère pour les plants qui peuvent avoir des problèmes de reprise de végétation et la non-spécificité de destruction des champignons. (2) Le traitement avec des molécules naturelles, *i.e.* le chitosane (Nascimento *et al.* 2007), l'acide salicylique (Amborabé *et al.*

2002) et la cystéine (Octave *et al.* 2005). La comparaison de ces approches n'a pas été réalisée.

## **2.2 *Pythium oligandrum* peut-il être un micro-organisme de biocontrôle ?**

A coté de *Pseudomonas* spp. *Trichoderma* spp. et *Fusarium oxysporum*, qui sont les agents microbiens les plus étudiés en recherche, d'autres micro-organismes comme *Pythium 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).

La première description, réalisée par Dreschler, de l'oomycète *P. oligandrum* date de 1930. Longtemps considéré uniquement comme un micro-organisme non pathogène (Al-Hamdani et Cooke 1983 ; Kilpatrick 1968 ; Martin et Hancock 1986), plusieurs publications ont successivement montré que cet oomycète tellurique avait aussi des propriétés d'agent de lutte biologique (ou de biocontrôle). Depuis 1986, au moins 44 publications ont rapporté que *P. oligandrum* peut mettre en place plusieurs mécanismes permettant la protection des plantes. Ainsi, il peut agir (1) directement contre les agents pathogènes fongiques par des modes d'action distincts ou combinés : mycoparasitisme, antibiose, compétition nutritive, et/ou (2) indirectement par induction de résistance chez les plantes. Plusieurs pathologies importantes des cultures ont pu être contrôlées par *P. oligandrum*, la réduction de l'incidence des maladies variant de 15% à 100% en fonction de la plante hôte, de l'agent pathogène cible et de la méthode d'application (Brozova 2002 ; Rey *et al.* 2008 ; Benhamou *et al.* 2012).

La publication jointe ci-après (soumise à la revue Applied and Environmental Microbiology) a pour objectif principal de décrire en détail les modes d'action de *P. oligandrum* et les relations qu'il établit avec la plante et les autres micro-organismes au sein de l'agrosystème. L'exemple de *P. oligandrum* sera utilisé pour illustrer les avantages et limites du biocontrôle via l'utilisation de micro-organismes, cette description permettra certainement une meilleure compréhension de ce que nous pouvons attendre, à l'avenir, de cette méthode de protection des cultures qui suscite de nombreux espoirs et attentes.



# Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*

J. Gerbore · N. Benhamou · J. Vallance · G. Le Floch · D. Grizard · C. Regnault-Roger · P. Rey

Received: 2 February 2013 / Accepted: 6 May 2013  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

**Abstract** The management of certain plant beneficial microorganisms [biological control agents (BCAs)] seems to be a promising and environmental friendly method to control plant pathogens. However, applications are still limited because of the lack of consistency of BCAs when they are applied in the field. In the present paper, the advantages and limitations of BCAs are seen through the example of *Pythium oligandrum*, an oomycete that has received much attention in the last decade. The biological control exerted by *P. oligandrum* is the result of a complex process, which includes direct effects through the control of pathogens and/or indirect effects mediated by *P. oligandrum*, i.e. induction of resistance and growth promotion. *P. oligandrum* antagonism is a multifaceted and target fungus-dependent

process. Interestingly, it does not seem to disrupt microflora biodiversity on the roots. *P. oligandrum* has an atypical relationship with the plant because it rapidly penetrates into the root tissues but it cannot stay alive in planta. After root colonisation, because of the elicitation by *P. oligandrum* of the plant-defence system, plants are protected from a range of pathogens. The management of BCAs, here *P. oligandrum*, is discussed with regard to its interactions with the incredibly complex agrosystems.

**Keywords** Antibiosis · Biocontrol agent · Biocontrol efficacy · Induced resistance · Microbial communities · Mycoparasitism · Plant growth promotion

Responsible editor: Philippe Garrigues

J. Gerbore · J. Vallance · P. Rey (✉)  
INRA, ISVV, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE), 33140 Villenave d'Ornon, France  
e-mail: prey@bordeaux.inra.fr

J. Vallance · P. Rey  
Bordeaux Sciences Agro, Université de Bordeaux, ISVV, UMR1065 SAVE, 33140 Villenave d'Ornon, France

J. Gerbore · D. Grizard  
BIOVITIS, 15400 Saint Etienne de Chomeil, France

J. Gerbore · C. Regnault-Roger  
UMR CNRS 5254/IPREM-EEM, IBEAS, Université de Pau et des Pays de l'Adour, 64013 Pau, France

N. Benhamou  
Centre de Recherche en Horticulture, Pavillon de l'ENVIROTRON, Université Laval, 2480 Boulevard Hochelaga, Québec G1V 0A6, Canada

G. Le Floch  
Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, ESIAB, Université de Bretagne Occidentale, Université Européenne de Bretagne, 29280 Plouzané, France

## Introduction

Chemical pesticides used to control plant pathogens are frequently known for the negative impacts they may have on the environment and even on the consumers. This issue has become a matter of growing concern and societal pressure for healthy food, free of pesticides residues, compelling the research to rapidly develop environmental friendly methods. The Golden Age of chemical pesticides now seems to have gone with these concerns, and studies on biological control agents (BCAs) have increased significantly over the last years. However, in spite of the urgent need to find alternatives to pesticides, in Europe, only 14 BCAs genus of fungi, oomycete and bacteria microorganisms, such as *Trichoderma* spp., *Pythium oligandrum* and *Bacillus* spp., are currently registered in European regulation no. 1107/2009 (Table 1). Equally, *Pseudomonas* spp., *Trichoderma* spp. and *Fusarium oxysporum*, which are the three most studied groups of BCAs, others, like *P. oligandrum*, have received growing interest in the last decade.

**Table 1** Fungal, oomycete, and bacterial biocontrol agents registered in European regulation no. 1107/2009 (according to EU pesticides database [http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/).)

Biocontrol agent	Category	Status under registration	Date of approval	Authorised	Authorisation in progress
<i>Ampelomyces quisqualis</i> strain AQ10	Fungicide	Approved	01/04/05	BG, CY, DE, EL, ES, FR, IT, SI, UK	NL
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> D747	Fungicide	Pending			ES, IT
<i>Bacillus firmus</i> I-1582	Nematicide	Pending			ES
<i>Bacillus pumilus</i> QST 2808	Fungicide	Pending			ES
<i>Bacillus subtilis</i> str. QST 713	Fungicide+bactericide	Approved	01/02/07	DE, ES, FR, IE, IT, SI, UK	EL
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Aizawai</i> strains ABTS-1857 and GC-91	Insecticide	Approved	01/05/09	BE, CY, DE, EL, ES, FI, FR, IT, LU, NL, PT, SE	AT
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israeliensis</i> (serotype H-14) strain AM65-52	Insecticide	Approved	01/05/09	ES, FR, SE	
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> strains ABTS 351, PB 54, SA 11, SA12 and EG 2348	Insecticide	Approved	01/05/09	AT, BG, CY, CZ, DE, DK, EL, ES, FR, HU, IT, LT, LU, MT, NL, PL, PT, RO, SI, SK, UK	IE
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i> strain NB 176 (TM 14 1)	Insecticide	Approved	01/05/09	AT, EL, ES, FR, HU, IT	
<i>Beauveria bassiana</i> strains ATCC 74040 and GHA	Insecticide	Approved	01/05/09	BE, CY, EL, ES, FR, HU, IE, IT, NL, SE, SI, UK	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Fungicide+bactericide	Pending		AT, BE, FR, HU	ES, IT, SI, SK
<i>Candida oleophila</i> strain O	Fungicide	Pending		FR, UK	ES
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> Apopka strain 97	Fungicide	Approved	01/07/01	BE, FI, LU, NL, SE	AT
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> strain Fe9901	Nematicide	Pending		BE, BG, FR	ES, IT
<i>Paecilomyces lilacinus</i> strain 251	Nematicide	Approved	01/08/08	BG, IT	
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> strain MA342	Fungicide	Approved	01/10/04	AT, BE, DE, DK, ES, FI, FR, IT, LT, LU, NL, SE, UK	PT
<i>Pseudomonas</i> sp. strain DSMZ 13134	Fungicide	Pending		NL, SE	AT, BE, ES
<i>Pseudozyma flocculosa</i>	Fungicide	Pending			ES
<i>Pythium oligandrum</i> M1	Fungicide	Approved	01/05/09	CZ, HU, PL, SK	AT
<i>Streptomyces</i> K61 (formerly <i>S. griseoviridis</i> )	Fungicide	Approved	01/05/09	BE, CY, EE, EL, ES, FI, HU, IT, LT, NL, SE	
<i>Streptomyces lydicus</i> WYEC 108	Fungicide+bactericide	Pending			ES
<i>Trichoderma asperellum</i> (formerly <i>T. harzianum</i> ) strains ICC012, T25 and TV1	Fungicide	Approved	01/05/09	ES, FR, IT, SI	
<i>Trichoderma asperellum</i> (strain T34)	Fungicide	Approved	01/06/13		ES
<i>Trichoderma atroviride</i> (formerly <i>T. harzianum</i> ) strains IMI 206040 and T11	Fungicide	Approved	01/05/09	ES, IT, SE	
<i>Trichoderma atroviride</i> strain I-1237	Fungicide	Approved	01/06/13	FR	ES
<i>Trichoderma gamsii</i> (formerly <i>T. viride</i> ) strain ICC080	Fungicide	Approved	01/05/09	ES, SI	
<i>Trichoderma harzianum</i> strains T-22 and ITEM 908	Fungicide	Approved	01/05/09	BE, ES, FR, NL	SE
<i>Trichoderma polysporum</i> strain IMI 206039	Fungicide	Approved	01/05/09	ES, SE	
	Fungicide	Approved	01/05/09	NL	

**Table 1** (continued)

Biocontrol agent	Category	Status under registration	Date of approval	Authorised	Authorisation in progress
<i>Verticillium albo-atrum</i> (formerly <i>Verticillium dahliae</i> ) strain WCS850	Fungicide	Approved	01/01/04	AT, BE, CZ, DE, DK, EL, ES, FR, HU, IE, IT, LU, NL, PL, SE, SK, UK	PT
<i>Coniothyrium minitans</i>					
<i>Lecanicillium muscarium</i> (formerly <i>Verticillium lecanii</i> ) strain Ve6	Insecticide	Approved	01/05/09	EL, FI, FR, NL, UK	BE

DE Germany, AT Austria, BE Belgium, CY Cyprus, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, EL Greece, HU Hungary, IE Ireland, IT Italy, LT Lithuania, LU Luxembourg, MT Malta, CZ Czech, NL Netherlands, PL Poland, PT Portugal, RO Romania, UK United Kingdom, SK Slovakia, SE Sweden

The first description by Dreschler of the oomycete, *P. oligandrum*, dates back to 1930. It was long considered as a non-pathogenic microorganism (Al-Hamdani and Cooke 1983; Kilpatrick 1968; Martin and Hancock 1986), and, over time, several reports have convincingly demonstrated its biocontrol properties (Table 2). Since 1986, at least 44 publications have shown that *P. oligandrum* acts either directly or indirectly to protect the plants. It interacts directly with the fungal pathogens through distinct or combined mode of actions, such as mycoparasitism, antibiosis, nutrient and space competition, and/or indirectly by inducing resistance in the plants. An impressive number of diseases of various plants can be controlled by *P. oligandrum*, the reduction of pathogenic attacks varying from 15 to 100 %, depending on the host plant, the target pathogen and the application method. Some experiments have been made in the field, but most of them were carried out in greenhouses or at the laboratory scale.

Despite the hope raised by the use of BCAs and the research currently being done, the application of microbiological control by farmers is still limited (Alabouvette et al. 2006). This is usually explained by the lack of consistency when BCAs are applied in the field (Alabouvette et al. 2009). As regards *P. oligandrum*, our objective in this review is to describe its modes of action and relationships with the plant and the microflora. Since it shares many of the benefits and limitations of BCAs, it will certainly lead to an improved understanding of what we can expect in the future with this method of controlling plants.

***P. oligandrum* relationships within agrosystem**

Knowledge of the relationship between a biocontrol agent and its environment, including microbial communities and the host plants, is essential to improve BCAs field efficacy. Determining how these complex systems interact will also

be helpful in managing plant protection using BCAs (Edel-Hermann et al. 2009; Savazzini et al. 2009).

***P. oligandrum* relationships with plants**

The oomycete *P. oligandrum* has been isolated from the rhizosphere of many plants (Ali-Shtayeh 1985; Klemmer and Nakano 1964; Kobayasi et al. 1977; Martin and Hancock 1986; Mulligan and Deacon 1992; Plaats-Niterink 1981; Ribiero and Butler 1992; Schmitthenner 1962; Vaartaja and Bumbieris 1964), and the relationships with roots have been particularly regarded for tomato. According to Le Floch et al. (2005) and Rey et al. (1998a), the relationship was qualified as an atypical interaction because it differed from all the plant/*Pythium* and plant/BCAs relationships previously described (Benhamou et al. 2012; Rey et al. 2008). Usually, non-pathogenic *Pythium* species do not penetrate into the root tissues, or else, they are immediately halted at the epidermis or the first layers of cortical root cells (Rey et al. 1998b). Although *P. oligandrum* does not damage plants, it can penetrate rapidly into the root tissues, and its ingress is even as rapid as pathogenic *Pythium*; but conversely to them, it does not cause damage in the plant tissues (Rey et al. 1996, 1998b). After root inoculation with *P. oligandrum*, electron microscopic observations and cytochemical labelling revealed that the oomycete first colonised rapidly and deeply the cortical area of tomato roots in <12 h, then the hyphae started to degenerate, while only a few host reactions appeared. Finally, after 48 h, most hyphae were empty, with only oospores being located in the root tissues, but these structures also died, as shown by their typical empty shell appearance. An important finding is that further to this interaction, in addition to the lack of root symptoms, induced resistance was observed in the plant, as well as plant growth promotion.

**Table 2** List of publications on *P. oligandrum* biological control of plant pathogens

Mechanisms described	Crop	Pathogen	Protection level (%)	Year	Author	Experiment
Mycoparasitism	Agaricus bisporus	–	–	1990	Fletcher et al.	In vitro
Mycoparasitism	Peas	<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>pisi</i> , <i>Phoma medicaginis</i> var. <i>pinodella</i> and <i>Mycosphaerella pinodes</i>	–	1991	Bradshaw-Smith et al.	In vitro
Mycoparasitism	Tomato	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-4, <i>Pythium ultimum</i> , <i>Pythium spinosum</i> and <i>Pythium irregulare</i>	≈70	1992	He et al.	-
Mycoparasitism	Wheat	<i>Pythium ultimum</i>	100	1997	Abdelzaher et al.	In vitro
Mycoparasitism	-	Sclerotia of <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	≈50	1999	Madsen and Neergaard	In vitro, field
Mycoparasitism	Cucumber	<i>Pythium ultimum</i>	≈37	1999	Ali-Shtayeh and Saleh	In vitro
Mycoparasitism	–	<i>Phytophthora parasitica</i>	–	2000a	Picard et al.	In vitro
Mycoparasitism	–	Sclerotia of <i>Botrytis cinerea</i> and <i>Sclerotinia minor</i>	–	2005	Rey et al.	In vitro
Mycoparasitism	–	<i>Pythium ultimum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	–	2006	El-Katatny et al.	In vitro
Mycoparasitism	–	<i>Phytophthora parasitica</i>	–	2012	Horner et al.	In vitro
Mycoparasitism	Sugar beet, cress	<i>Pythium</i> spp.	≈26–33	1990, 1992, 1998	McQuilken et al.	Greenhouse
Mycoparasitism, antibiosis	–	<i>Pythium ultimum</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Phytophthora megasperma</i> , <i>Verticillium albo-atrum</i>	–	1999	Benahmou et al.	In vitro
Mycoparasitism, plant growth promoting	Pepper	<i>Verticillium dahliae</i>	–	1998	Al-Rawahi and Hancock	In vitro, greenhouse
Mycoparasitism, plant growth promoting	Pepper	<i>Verticillium dahliae</i>	67	2007	Rekanovic et al.	Greenhouse
Mycoparasitism, plant growth promoting	Tomato	<i>Pythium dissotocum</i>	–	2009	Vallance et al.	Greenhouse
Induced resistance, mycoparasitism	Tomato	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Radici-lycopersici</i>	–	1997	Benhmou et al.	In vitro, greenhouse
Mycoparasitism, induced resistance	Potato	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-3	46–87	2012	Ikeda et al.	In vitro, field
Nutrient and/or space competition	Cress	<i>Pythium ultimum</i>	–	1983	Al-hamdani et al.	Field
Nutrient and/or space competition	Sugar beet +cress	<i>Pythium ultimum</i> and <i>Aphanomyces cochlioides</i>	–	2001	Whipps and McQuilken	Greenhouse
Nutrient and/or space competition	Sugar beet	<i>Aphanomyces cochlioides</i>	≈50	2013	Takenaka and Ishikawa	Greenhouse, field
Nutrient and/or space competition, mycoparasitism	Cotton	<i>Pythium ultimum</i>	32–66	1986	Martin and Hancock	In vitro
Nutrient and/or space competition, mycoparasitism	Sugar beat	<i>Pythium ultimum</i>	≈88	1987	Martin and Hancock	Greenhouse
Nutrient and/or space competition, mycoparasitism	Tomato	Pathogen communities of soil	≈15	2012	Cwalina-Ambroziak and Nowak	Greenhouse
Plant growth promotion	Rice	–	–	1993	Cother and Gilbert	Greenhouse

**Table 2** (continued)

Mechanisms described	Crop	Pathogen	Protection level (%)	Year	Author	Experiment
Plant growth promotion	Cucumber	–	–	1994	Kratka et al.	-
Plant growth promotion	Cucumber	–	–	1998	Wulff et al.	In vitro
Induced resistance	Tomato	<i>Phytophthora parasitica</i>	60	2000a, b	Picard et al.	Greenhouse
Induced resistance	Tomato	<i>Ralstonia solanacearum</i>	≈33	2008	Takenaka et al.	In vitro
Induced resistance	Sugar beet	<i>Aphanomyces cochlioides</i>	≈33	2006	Takenaka et al.	In vitro
Induced resistance	Tobacco	<i>Phytoplasma</i>	≈40	2003	Lherminier et al.	Greenhouse
Induced resistance	Tomato	<i>Ralstonia solanacearum</i>	–	2009	Masunaka et al.	In vitro
Induced resistance	Sugar beet	<i>Cercospora beticola</i>	12–52	2009	Takenaka et al.	In vitro, field
Induced resistance	Strawberry	<i>Botrytis cinerea</i> + <i>Sphaerotheca macularis</i> + <i>Mycosphaerella fragariae</i>	43–70	2010	Meszka and Bielenin	Field
Induced resistance	Tomato	<i>Botrytis cinerea</i>	≈30	2009	Le Floch et al.	Greenhouse
Induced resistance	Grapevine	<i>Botrytis cinerea</i>	75	2007	Mohamed et al.	In vitro
Induced resistance	Tomato	<i>Botrytis cinerea</i>	79	2011	Lou et al.	Greenhouse
Induced resistance	Tomato	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Radicis-lycopersici</i>	84	2001	Benhamou and Garand	Greenhouse
Induced resistance	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i> , <i>Pseudomonas syringae</i>	87	2009	Kawamura et al.	Greenhouse
Induced resistance	Sugar beet and wheat	<i>Rhizoctonia solani</i> AG-2.2, <i>Fusarium graminearum</i>	34	2003	Takenaka et al.	In vitro
Induced resistance	Tomato	<i>Ralstonia solanacearum</i>	≈40	2006, 2008	Hase et al.	In vitro
Induced resistance, plant growth promotion	Tomato	<i>Botrytis cinerea</i>	≈50	2003a, b	Le Floch et al.	Greenhouse

*P. oligandrum* plant relationships differed also from those of BCAs, such as *Trichoderma* spp. and *F. oxysporum* (Fo47) (Alabouvette et al. 2009; Howell 2003) because (1) the root colonisation of the two fungi was restricted to the surface or the upper cortical layers and (2) intense host reactions were set up once the fungi attempted to or managed to penetrate inside these root layers (Benhamou et al. 2001, 2002; Harman et al. 2004; Olivain and Alabouvette 1997, 1999; Olivain et al. 2006; Yedidia et al. 1999). In 2009, Le Floch et al. compared Fo47, *P. oligandrum* and *Trichoderma harzianum* interactions with tomato roots. Among the three-biocontrol agents, the *T. harzianum* strain they used was not able to penetrate into the root tissues. Fo47 hyphae penetrated the outer cortical root cells but *P. oligandrum* ingress was faster and deeper. A degenerative process was observed for the two microorganisms consecutively to cells invasion, but with Fo47, it was concomitant with the hyphae ingress in the plant, whereas with *P. oligandrum*, it appeared suddenly once the oomycete hyphae were deeply located in the inner cortical tissue. Thus, BCA interaction with the same host plant can differ significantly. We currently do not know whether the ability to deeply penetrate into the roots provides advantages over the

other BCAs that are localised only at the root surface, but, as shown by Benhamou et al. (1997), it can lead to mycoparasitism in the inner roots. However, as the lifetime of *P. oligandrum* hyphae in the plant is short (<12 h), this phenomenon is only transient and cannot be considered as a biocontrol mechanism of the uttermost importance. As subsequent induced resistance occurred after plant interaction with *P. oligandrum*, one can assume that hyphae penetration inside the plants may help and promote the plant to react more rapidly and significantly to pathogenic infections. Nevertheless, experiments have to be done to verify this specific point.

***P. oligandrum* relationships with fungi**

Many interactions between microorganisms occurred in the rhizosphere. They have been reproduced many times in vitro by confronting two microorganisms in Petri dishes. A BCA is assumed to control pathogens through various modes of action. In the literature, reports have shown that *P. oligandrum* is able to directly attack several fungal pathogens, using different mechanisms (Benhamou et al. 1997,

1999; Picard et al. 2000a; Rey et al. 2005). Depending on the fungal target, these include mycoparasitism and antibiosis. Some particular interactions with fungi that produced defence reactions to prevent *P. oligandrum* attacks have also been observed. In addition, the various types of interaction with sclerotia underline the multifaceted relationship that the oomycete established with fungi.

#### Mycoparasitism

*P. oligandrum* mycoparasitism is characterised by active growth along the host hyphae and the production of enzymes that degrade or break the host cell wall. *P. oligandrum* penetration inside the host cells was associated with the complete destruction of the cytoplasm of host cells, with the host finally dying. This process can be observed, for instance, in the interaction with *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) or *Pythium ultimum*. In these interactions, hydrolytic enzymes such as chitinases and cellulases are clearly involved (Benhamou et al. 1997, 1999). Against another oomycetes, for instance, *Phytophthora megasperma*, *P. oligandrum* is able to produce great quantities of cellulolytic enzymes as shown by Picard et al. (2000a). Recently, the nature of *P. oligandrum* mycoparasitism was studied at the molecular level by Horner et al. (2012). A complementary DNA library was constructed, and transcripts encoding proteases, protease inhibitors, glucanases, putative effectors and elicitors were identified during *P. oligandrum* interaction with heat-killed *P. infestans* hyphae. This set of proteins may act during mycoparasitism, but further investigations are needed to determine the role of each of the identified proteins. It was noticed that the level of mycoparasitism can be dependent on nutrient stress. Butler (1957) studied *Rhizoctonia solani* mycoparasitism on several fungal hosts, i.e. mainly mucorales species (Phycomycetes) and concluded that regular growth depended on temperature, nutrition and light but that this growth was a prerequisite for heavy parasitism. Thus, we can hypothesise that, in harsh environments, this mode of action is consistently attenuated.

#### Antibiosis

Antibiosis has long been known and is defined as the specific interaction in which the prey is destroyed by toxic secondary metabolites produced by antagonistic microorganisms (Alabouvette et al. 2009; Baker 1968; Fravel 1988; Haas and Défago 2005; Wright 1956). As regards *P. oligandrum*, this phenomenon was studied by Bradshaw-Smith et al. (1991) against the three major footrot pathogens of pea: *Fusarium solani* f. sp. *pisi*, *Phoma medicaginis* var. *pinodella* and *Mycosphaerella pinodes*. A volatile antibiotic compound produced by *P. oligandrum* reduced the growth

rate of *P. medicaginis* and *M. pinodes*, but this molecule has not been yet purified and identified. Another typical phenomenon of antibiosis was reported by Benhamou et al. (1999) when they observed the degradation of *P. megasperma* without physical contact with *P. oligandrum* hyphae. Note that nutrient stress can impact these antagonistic performances and that the production of such compounds is also dependent on abiotic factors.

As mentioned by Rey et al. (2008), mycoparasitism and antibiosis can be observed during the same interaction with a fungal host. Microscopic observations made by Benhamou et al. (1997, 1999) led to the conclusion that antibiosis might precede mycoparasitism, which is associated with hydrolytic enzyme production against *F. oxysporum*. We can hypothesise that *P. oligandrum* modulates the production of antifungal compounds depending on the target pathogen, leading to two strategies: either mycoparasitism, associated with hydrolytic enzymes, or parasitism via antibiosis. The former strategy seems more frequent than antibiosis. These results indicate that one of the main advantages in using BCAs is the variety of interactions that they can establish with the fungal hosts. *P. oligandrum* seems to adapt to the fungal pathogens and attempts to destroy them by mycoparasitism, antibiosis, or a combination of the two processes (Benhamou et al. 2012). This reflects the multiplicity of interactions that exist in nature.

#### Nutrient and space competition

As proposed by Alabouvette et al. (2006), this is defined as a general phenomenon regulating the population dynamics of microorganisms sharing the same ecological niche and physiological requirements when the resources are limited. As regards *P. oligandrum*, nutrient and space competition was thought to be involved in at least one case. Martin and Hancock (1986) observed that elevated concentration of chloride raised propagule densities of *P. oligandrum*, allowing successful competition with *P. ultimum*, leading to soil suppressiveness against the pre-emergence damping off of cotton. A relatively similar mode of action was reported for *T. harzianum* against *R. solani* on radish (Lui and Baker 1980) and *F. oxysporum* against fusarium wilt on melon (Alabouvette et al. 1979, 1983). Even if this mode of action is the principal one in microbial antagonism for suppressing pathogens causing the decay of harvested fruits and vegetables (Sharma et al. 2009), this mechanism is considered difficult to exploit for biological control (Alabouvette et al. 2006), in particular for soilborne pathogens whose interactions are numerous. Benhamou et al. (2012) reported that French and Japanese studies on *P. oligandrum* described mycoparasitism and/or induced resistance as the main modes of action. Thus, the competition for

space and nutrients is probably a minor mechanism used for biological control by *P. oligandrum*.

#### Fungal defence reactions against *P. oligandrum* mycoparasitism

Plant defence reactions are induced after recognition of microbial effectors. Some fungi are able to activate structural defence reactions after microbial recognition. Currently, little is known about this kind of reaction, but two studies on *P. oligandrum* report this kind of finding. Picard et al. (2000a) observed in *P. oligandrum*–*Phytophthora parasitica* confrontation a pathogen defence reaction to the biocontrol agent prior to direct contact. It was characterised by a global production of cellulose-enriched material around all the hyphae wall of *P. parasitica*. Benhamou et al. (1999) found that in *P. oligandrum*–*R. solani* interaction, a chitin-rich deposit accumulated in the wall of the pathogen at potential sites of penetration by the biocontrol agent. These two studies showed that two patterns of fungal defence response can be set up on the cell wall of fungi, with one being localised and the other more generalised to the entire hyphae. These pathogen defence reactions were, in the two cases, not strong enough to stop *P. oligandrum* penetration and invasion of the reacting host cell, thus demonstrating that the great ability of *P. oligandrum* to produce large amount of cell wall degrading enzymes is of major importance. Evidence was provided that host defence reactions were initiated by molecules secreted by *P. oligandrum*, but so far, no molecules have been identified.

#### Microbial antagonists of *P. oligandrum*

*P. oligandrum* can also be attacked by some fungi. Many examples of cell damage to the oomycete were observed after *P. oligandrum* interaction with *R. solani* (Benhamou et al. 1999). Both microorganisms, the pathogen and the antagonist, were marked by morphological alterations, and 3 days after the start of the interaction, *R. solani* clearly collapsed and the hyphae cells of *P. oligandrum* became disorganised. Other fungi are known to attack *P. oligandrum*. Le Floch et al. (2009) observed that, in Petri dishes, *F. oxysporum* (Fo47) and *T. harzianum* destroyed *P. oligandrum* cells, mainly through a combination of antibiosis and mycoparasitism. It could also happen that a strain belonging to the same plant pathogenic species, e.g. *Pythium aphanidermatum*, can be mycoparasited by *P. oligandrum*, while another strain displayed mycoparasite-like ability against *P. oligandrum* (Benhamou et al. 1999; Jones and Deacon 1995). These results indicate the complexity of the *P. oligandrum*/host interactions in nature partly explaining why some biocontrol experiments aimed at protecting plants fail or are successful.

#### *P. oligandrum* and fungal resting structures

*P. oligandrum* is also able to attack resting structures such as sclerotia (Foley and Deacon 1986). Madsen and Neergaard (1999) reported that, in comparison with the control treatment, survival of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia was reduced by 50 % after *P. oligandrum* soil treatment. The same result was observed when sclerotia were treated with *P. oligandrum* culture filtrate. The oomycete is able to use sclerotia as sole nutrient source to complete its entire life cycle. It produces cell wall degrading enzymes, endochitinase, protease,  $\beta$ -glucanase,  $\beta$ -glucosidase and cellobiohydrolase to attack sclerotia. Foley and Deacon (1986) previously described the ability for *P. oligandrum* to feed from sclerotia exudates. These results underlined that *P. oligandrum* has a great array of degradative enzymes able to penetrate into resting structures like sclerotia and that it can be useful for biological control strategy aimed at reducing sclerotia (primary inoculum). Certain sclerotia seem, however, to be resistant to *P. oligandrum* attacks. For instance, Rey et al. (2005) demonstrated that *Botrytis cinerea* sclerotia were sensitive, while the *S. minor* ones were not. Melanin, a compound that entirely covers *S. minor* sclerotia, apparently protects the rind cells against enzymes from antagonist microorganisms (Bull 1970). In this case, *P. oligandrum* attack failed, and it could not penetrate inside the *S. minor* sclerotia. To support this assumption, Rey et al. (2005) reported that *P. oligandrum* entered *B. cinerea* sclerotia but only through breaches, at the junction of rind cells, that also corresponded to gaps in melanin deposits.

Taken together, these observations show that *P. oligandrum* is able to mycoparasite a broad range of pathogens and, depending on the host, can adjust its attack. For BCA registration, it is worth considering various pathogenic targets. The broad spectrum of *P. oligandrum* hosts suggests that it is important to manage the great variety of interactions that can lower or increase the efficiency of biological control.

#### *P. oligandrum* relationships with the environment

Natural ecosystems are incredibly complex, and the relationship of a BCA with the environment is still difficult to predict and manage. Interactions occur not only with biotic factors but also with abiotic ones.

#### Rhizosphere colonisation ability

As mentioned in the literature, *P. oligandrum* is rhizospheric competent (Al-Rawahi and Hancock 1998; Le Floch et al. 2003a; McQuilken et al. 1990; Takenaka et al. 2008). Successful plant protection by a BCA needs its establishment in

the field over the whole span of the culture. In a hydroponic greenhouse, Le Floch et al. (2003a, 2007) reported that optimal protection was obtained when tomato roots were heavily colonised by *P. oligandrum*. In soilless culture, *P. oligandrum* root colonisation depended on the nature of substrates. For instance, Rey et al. (1999) pointed out that a higher level of colonisation was observed in an organic substrate (peat) than in an inorganic one (rockwool). Thus, inoculation strategies must be adapted to the type of culture. To improve *P. oligandrum* colonisation and persistence, Vallance et al. (2009) selected three strains on the basis of their ability to form oospores, to produce an elicitor as well as an auxin-like compound. Finally, the advantage of using a combination of three *P. oligandrum* strains to increase persistence of the strains was shown. However, this study also demonstrated that the screening procedure is of the utmost importance in selecting strains. The experiment made in the laboratory to select the strains did not necessarily reflect their ability to colonise roots in greenhouse conditions. At the present time, this point is a major limitation for the selection of *P. oligandrum* strains for biological control. On the same basis, it is worth noting that the right method needs to be used in order to count and check whether the BCA does or does not colonise the plant. Le Floch et al. (2007) showed that molecular (quantitative real-time PCR and DNA macroarray) and culture-dependent methods to monitor *P. oligandrum* populations provided contradictory results. When a selective medium was used, *P. oligandrum* persisted for 3 months, but, according to quantitative real-time PCR and DNA macroarray, the oomycete was able to persist on roots for 6 months, suggesting that one treatment was sufficient. Weaver et al. (2005) obtained the same type of variation between molecular and cultural analyses when they monitored *Trichoderma virens* populations in soil. Thus, particular attention has to be paid in selecting the methods for monitoring the colonisation of a given BCA.

#### Impact on microflora

To protect plants, as a great number of BCAs cells are introduced in the culture, the risk assessment of the use of BCAs on indigenous microflora has to be determined. Currently, few studies deal with the impact of BCA on microbial communities. Vallance et al. (2009, 2012) studied the impact of *P. oligandrum* on the fungal and bacterial communities colonising the rhizosphere of tomato plants. A fingerprinting analysis made by single-strand conformation polymorphism revealed that, 6 months after root inoculation with *P. oligandrum*, native fungal communities were similar in tomato roots treated or not with *P. oligandrum*. Investigations on bacterial communities showed transient perturbations in rhizospheric indigenous bacterial communities for the plant treated with *P. oligandrum*. However, this shift did

not persist until the end of the cropping season. In fact, in the two studies, bacterial and fungal community shifts were observed over the growing season, but the biocontrol agent had no or little influence on the indigenous microflora. Savazzini et al. (2009) reported that a transient shift in bacterial and fungal communities colonising the vineyards soils was observed only during the first 2 weeks following inoculation with *Trichoderma atroviride* SC1. Edel-Hermann et al. (2009) obtained similar conclusions concerning *F. oxysporum* introduction in soil. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis showed that bacterial and fungal communities were not significantly affected by the BCA, but evolved over time.

Consequently, the environmental conditions had a greater influence on the communities than the biocontrol agent application. Concerning the biodiversity of the microflora, those results are favourable to fungal or oomycete BCA regarding the weak impact that they have on the native microbial communities colonising the roots.

#### Influence of abiotic factors on *P. oligandrum*

The abiotic factors, in association with the biotic ones, certainly have an important role on BCAs behaviours in the field. Little is known about the influence of abiotic factors on biocontrol efficacy. *P. oligandrum* is a common inhabitant of soils (Rey et al. 2008), and recently, strains were isolated (Gerboire, unpublished data) from the vineyards planted in soils with various physico-chemical properties. This capacity to colonise plants growing in various soils is important for a BCA; it means that it could be applied in various environments. Nevertheless, many questions have still to be addressed, such as the impact of cultural practices on BCAs populations. All these factors can have a significant impact on the level of protection.

#### ***P. oligandrum* plant induction of resistance and plant-growth promotion**

Biocontrol agents such as *T. harzianum*, *F. oxysporum* strain Fo47, and *P. oligandrum* also have an indirect effect on diseases through the induction of plant disease resistance. Interestingly, another beneficial effect, the growth promotion of plants, is associated with the colonisation of roots (Benitez et al. 2004; Fravel et al. 2003; Le Floch et al. 2003b; Rey et al. 2008).

#### **Induced plant resistance**

Several experiments have reported that treatment of plants with *P. oligandrum* hyphae or its elicitors, oligandrin and

cell wall proteins (CWPs), induced plant resistance (Benhamou et al. 1997; Le Floch et al. 2003a; Lherminier et al. 2003; Masunaka et al. 2010; Mohamed et al. 2007; Picard et al. 2000b; Takenaka et al. 2003, 2006, 2008).

#### Induction of plant resistance by *P. oligandrum* hyphae

After the introduction of *P. oligandrum* in the rhizosphere, the oomycete induces resistance at the local level, i.e. in the roots but, as shown by Le Floch et al. (2003a), this effect is also systemic, extending to all the parts of the plant. Using transmission electron microscopy (TEM) observations, Benhamou et al. (1997) first described locally induced resistance in tomato roots challenged with pathogen FORL. The host resistance was characterised by an enhanced response to pathogenic attack in comparison to the non-challenged *P. oligandrum* infected plants. TEM observation showed wide accumulation of phenolic and callose in *Fusarium*-challenged-*P. oligandrum*-inoculated tomato roots.

In the plants, resistance to various plant pathogenic fungi, i.e. *FORL*, *B. cinerea*, *P. ultimum* and *R. solani*, are induced by *P. oligandrum* (Benhamou et al. 1997; Brozova 2002; Le Floch et al. 2003a). This broad spectrum of pathogenic attack control is in favour of a non-specific plant stimulation of defences. As regards the systemic resistance, Le Floch et al. (2003a), showed an increased induction of PR proteins, i.e. PR-3b, PR-5a and a new isoform of PR-3b, in tomato plants colonised at root level by *P. oligandrum*, and then infected on leaves with *B. cinerea*. Interestingly, the synthesis of PR proteins was only triggered in *P. oligandrum*-treated plants when the leaves were attacked by the pathogen. This phenomenon, called “priming”, corresponds to a particular physiological status in which plants trigger their defence mechanisms more rapidly and at higher level when attacked by a given pathogen (Conrath et al. 2002; Conrath 2009; Jung et al. 2009).

Other studies reported that systemic resistance is induced by many other BCAs, e.g. *Trichoderma* spp. and *F. oxysporum* (Harman et al. 2004; Veloso and Diaz 2012) on a broad range of host plant. A biocontrol agent is, thus, not necessarily specific to a host plant and can trigger general defence responses to control several pathogenic attacks. This argues in favour of the registration of these microorganisms to control not only one disease or a few diseases, as it is the case for chemical control methods, but also against various plant pathogenic microorganisms, fungi as well bacteria.

#### *P. oligandrum* elicitors

*P. oligandrum* produces two types of elicitor, either secreted by the oomycete or extracted from its cell wall. Masunaka et

al. (2010) reported that these two elicitors, e.g. oligandrin and CWPs, are specific to this oomycete.

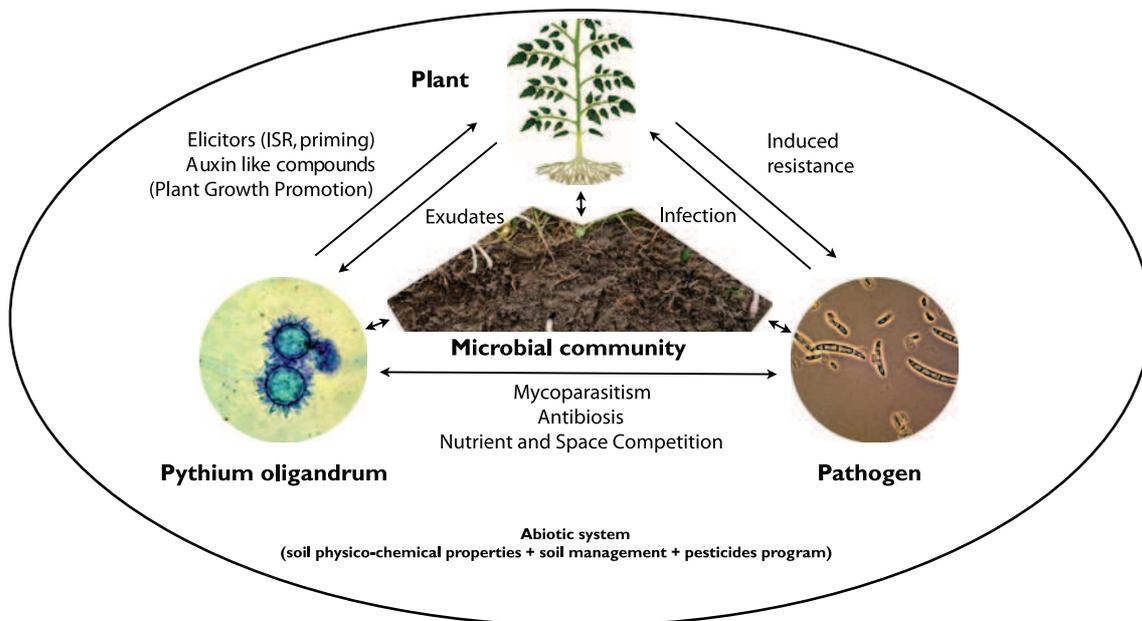
Picard et al. (2000b) discovered an extracellular protein from culture filtrate of the oomycete, named oligandrin. This 10 kDa protein was classified as an elicitor-like protein because of the similarity it shared with the classical elicitor “signature” described by Ponchet et al. (1999). Oligandrin has been successfully used to induce systemic resistance in tobacco (Lherminier et al. 2003) against phytoplasma infection, in tomato against *P. parasitica*, *B. cinerea* and FORL (Benhamou et al. 2001; Lou et al. 2011; Picard et al. 2000b) and in grapevine against *B. cinerea* (Mohamed et al. 2007). This protein induces defence responses but without triggering the hypersensitive reaction (HR) associated with necrotic response (Picard et al. 2000b). Mohamed et al. (2007) compared the application of oligandrin alone or of *P. oligandrum* oospore inoculum on grapevine roots to control *B. cinerea*. The protection level in plant pre-treated leaves reached 75 %, and no significant differences were observed after treatment either with the biocontrol agent, or its elicitor.

The second type of elicitor, classified as an elicitor-like protein (Takenaka et al. 2006), corresponds to cell wall proteins (CWPs), coded POD-1 and POD-2 by Takenaka et al. (2003). Protection via induced resistance was obtained against bacterial and fungal pathogens, i.e. *Ralstonia solanacearum* and *Pseudomonas syringae* on *Arabidopsis* (Kawamura et al. 2009); *Cercospora beticola*, *Rhizoctonia solanacearum* and *Aphanomyces cochlioides* on sugar beet (Takenaka et al. 2006, 2003; Takenaka and Tamagake 2009); and against *Fusarium graminearum* on wheat (Takenaka et al. 2003). Regarding the protection obtained after either POD-1 or POD-2 treatment of plants, Takenaka et al. (2006) obtained equivalent disease protection of sugar beet against *A. cochlioides* with the two CWPs. Nevertheless, distinctness was observed in the number of defence-related genes induced, five genes for POD-1 and three for POD-2. The authors assumed that the two elicitors may induce distinct defence reactions, even if the same protection level is observed.

Combining the two CWPs and oligandrin to stimulate more genes could provide an opportunity to increase plant protection. Another interesting point about these proteins is that the two types of elicitor are not specific to plant species, which is consistent with results obtained with *P. oligandrum* hyphae.

#### Induced plant growth promotion

Microorganisms promoting plant growth are the object of numerous studies, as shown by the literature dedicated to plant growth promoting rhizobacteria and fungi (Bloemberg and



**Fig. 1** Summary of *Pythium oligandrum* interactions with its natural environment. ISR induced systemic resistance

Lugtenberg 2001; Lugtenberg and Kamilova 2009; Hyakumachi and Kubota 2003; Mallik and Williams 2008). This phenomenon is frequently associated with the microbial production of phytohormones and secondary metabolites by the microorganisms (Helman et al. 2011; Hermosa et al. 2012; Kloepper et al. 1991; Lifshitz et al. 1987). *P. oligandrum* induction of plant growth promotion has also been the subject of studies performed by various authors (Al-Rawahi and Hancock 1998; Cother and Gilbert 1993; Kratka et al. 1994; Le Floch et al. 2003b; Rekanovic et al. 2007; Wulff et al. 1998). Plant growth promotion occurs after what seems to be a latent period. For instance, Wulff et al. (1998) observed this phenomenon when they applied *P. oligandrum* zoospores on cucumber seedlings. The first 2 days, *P. oligandrum* inoculation caused adverse effects on root seedlings; then, root elongation was stimulated. Rey et al. (1998a) proposed an explanation for these two phases. The first phase is assumed to correspond to the first stage of *P. oligandrum* hyphae penetration in the root tissues; it induces a slight defence response, which is cost effective in terms of energy. After this initial phase, plant growth is promoted. In some cases, this beneficial effect could persist for several months, as shown for tomato plants growing in soilless culture (Le Floch et al. 2003a). Plant growth promotion was associated with the production of auxinic compounds. Le Floch et al. (2003b) reported that the tryptamine pathway exists in the oomycete hyphae. *P. oligandrum* is able to metabolise an auxin-compound, tryptamine (TNH<sub>2</sub>), from tryptophan and indole-3-acetaldehyde. TNH<sub>2</sub> was absorbed by the root system and secondary roots subsequently developed. The tryptamine pathway is known in other non-pathogenic species such as *Aspergillus*, *Penicillium* and *Rhizopus* (Frankenberger and

Arshad 1995), but *P. oligandrum* differs from them because it cannot transform TNH<sub>2</sub> into indole-3-acetic acid (IAA). Interestingly, TNH<sub>2</sub> influx can boost IAA synthesis in tomato, even if it is not the major endogenous precursor of IAA in this plant (Cooney and Nonhebel 1991).

Production of this auxin-like compound (TNH<sub>2</sub>) in the rhizosphere can promote plant growth promotion of tomato plants, so a slight but frequent release of TNH<sub>2</sub> by *P. oligandrum* can be beneficial for plant development. Interestingly, roots are sensitive to very low concentrations of auxins (Taiz and Zeiger 1998), but the quantity of precursors such as tryptophan, which is naturally present in root exudates, can limit this phenomenon (Rybicka 1981). Note that this observation has been made for tomato, but whether this phenomenon occurs in other plants is still unknown.

### Biocontrol agent combinations

The idea of combining BCAs came from observations of suppressive soils, in which suppressiveness was attributed to microflora (Louvvet et al. 1976; Rouxel et al. 1979). Alabouvette and Lemanceau (1999) reported that soil suppressiveness to *Fusarium* wilts was attributed to the action of fluorescent *Pseudomonas*, saprophytic *Fusarium* such as *F. solani* and non-pathogenic *F. oxysporum*, in concert with abiotic factors, i.e. carbon and iron availabilities.

Consequently, in order to improve biocontrol consistency, one strategy could be to reproduce what occurs in certain suppressive soils. That would consist in opposing the diversity of pathogenic strains to another diversity made up of BCAs in a single inoculum. Such combinations can be made

either by combining BCAs strains of the same species or of several species. To increase rhizosphere colonisation, inoculum with several strains from the same species would probably be the best option. Combining several species of BCAs would provide the opportunity to associate various biocontrol modes of action and would certainly enhance plant protection.

In a 6-month experiment made in a soilless culture, Le Floch et al. (2003a) showed that tomato yield was increased after root colonisation by one strain of *P. oligandrum*. In order to enhance this positive effect on the plants, Le Floch et al. (2007) inoculated three selected strains of *P. oligandrum* on roots of tomatoes grown in the same cultural conditions. They showed that colonisation was effectively improved, but it was not associated with increased tomato yield, suggesting that this positive effect was not always easily reproduced.

Another experiment conducted by Le Floch et al. (2009) aimed at comparing tomato grey mould disease severity for plants treated with various BCAs inoculum. *P. oligandrum* was either alone or in combination with Fo47 or a combination with *T. harzianum*; a combination of the three BCAs was also tested. Even if in dual plate tests, Fo47 and *T. harzianum* destroyed *P. oligandrum* hyphae, the three microorganisms persisted when introduced together in the rhizosphere of tomatoes. Transmission electronic microscopy analysis showed that *P. oligandrum* was attacked by *T. harzianum* or Fo47 only when they were in close contact; otherwise, the three fungi persisted in the rhizosphere. This result underlined that complex interactions in the environment are difficult to predict even if laboratory studies provide relevant indications on the modes of action of each BCA.

Literature studies reported increased efficacy against *B. cinerea* on strawberry using yeast (*Pichia guilhermondii*) in combination with a bacterium (*Bacillus mycoides*; Guetsky et al. 2001 and 2002). However, this kind of result was not always obtained, as reported in numerical studies (Xu et al. 2010, 2011a) using models (Jeger et al. 2009) to determine the better efficient biocontrol strategies. The main conclusions to be drawn suggest first that a BCA with a single main mechanism is less effective in suppressing diseases than a BCA, which combines two mechanisms. Second, combining two BCAs with distinct modes of action is generally not better than applying a single BCA. Xu et al. (2011a) concluded that synergic effects between BCAs are difficult to predict and need a clear knowledge of their interactions. These results confirmed the global literature data review of Xu et al. (2011b) based on 36 publications concerning the use of combined BCAs. BCA associations can lead either to an increased, similar or sometimes lower protection efficacy. As regards *P. oligandrum*, Le Floch et al. (2009) demonstrated that for all the BCA treatments, plant-induced resistance to *B. cinerea* was observed, but that no significant differences were obtained after application of *P. oligandrum* on its own or in

combination with Fo47 and/or *T. harzianum*. Finally, synergic effects among BCAs would certainly be of interest for managing plant colonisation, but that does not necessarily increase the level of plant protection. Furthermore, dual culture tests of BCAs provided pieces of information on their ability to grow together, but it did not correlate with their ability to survive in the field, where various ecological niches exist.

## Conclusion

This paper on the advantages and limitations of *P. oligandrum* biocontrol stresses the main points to be considered in order to achieve efficient crop protection with a BCA. Figure 1 summarises the interactions of a biocontrol agent, here *P. oligandrum*, within an agrosystem. To colonise and persist in the rhizosphere, the oomycete must adapt to abiotic factors, e.g. soil physico-chemical and structural properties combined with soil management, pesticide programmes and also with biotic factors, e.g. plant hosts, microbial communities and plant pathogens. If the biocontrol agent is established in the soil, biological control can directly affect the pathogens via mycoparasitism, antibiosis and/or indirectly effect, via induced resistance to plant diseases with or without induced plant growth promotion. The fitness of strains is also very important. One of the main advantages in the use of BCAs comes from the minor impact that they have on microflora biodiversity. The impact of long-term biological control strategies will, however, have to be addressed to anticipate possible negative effects on environment. Finally, a major challenge for the scientific community in the coming years will be to (1) focus on field experiments, which, although they are time consuming, are of the utmost importance, and (2) make growers sensitive to these new kinds of control products.

**Acknowledgments** This research was supported by Biovitis SA, Saint-Etienne de Chomeil, France and the French “Association Nationale de la Recherche et de la Technologie”.

## References

- Abdelzaher HA, Elnaghy M, Fadl-Allah E (1997) Isolation of *Pythium oligandrum* from Egyptian soil and its mycoparasitic effect on *Pythium ultimum* var. *ultimum* the damping-off organism of wheat. *Mycopathol* 139(2):97–106
- Al-Rawahi AK, Hancock JG (1998) Parasitism and biological control of *Verticillium dahliae* by *Pythium oligandrum*. *Plant Dis* 82(10):1100–1106
- Alabouvette C, Rouxel F, Louvet J (1979) Characteristics of *Fusarium* wilt suppressive soils and prospects for their utilization in

- biological control. In: Schippers B, Gams W (eds) Soil-borne plant pathogens. Academic, London, pp 165–183
- Alabouvette C, Couteaudier Y, Louvet J (1983) Soils suppressive to *Fusarium* wilt: mechanism and management of suppressiveness. In: Parker CA (ed) The ecology and management of soilborne plant pathogens. American Phytopathological Society, St Paul, pp 101–106
- Alabouvette C, Lemanceau P (1999) Joint action of microbials for disease control. In: Hall F, Menn J (eds) Biopesticides: use and delivery. Methods in biotechnology. Humana, Totowa, pp 117–135
- Alabouvette C, Olivain C, Migheli Q, Steinberg C (2009) Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. New Phytol 184(3):529–544
- Alabouvette C, Olivain C, Steinberg C (2006) Biological control of plant diseases: the European situation. Eur J Plant Pathol 114(3):329–341
- Al-hamdani AM, Cooke RC (1983) Effects of the mycoparasite *Pythium oligandrum* on cellulolysis and sclerotium production by *Rhizoctonia solani*. Trans Br Mycol Soc 81:619–621
- Al-hamdani AM, Lutchmeah RS, Cooke RC (1983) Biological control of *Pythium ultimum*-induced damping-off by treating cress seed with the mycoparasite *Pythium oligandrum*. Plant Pathol 32(4):449–45
- Ali-Shtayeh MS (1985) *Pythium* populations in Middle Eastern soils relative to different cropping practices. Trans Br Mycol Soc 84:695–700
- Ali-Shtayeh MS, Saleh ASF (1999) Isolation of *Pythium acanthicum*, *P. oligandrum*, and *P. periplocum* from soil and evaluation of their mycoparasitic activity and biocontrol efficacy against selected phytopathogenic *Pythium* species. Mycopathologia 45:143–53
- Baker R (1968) Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. Annu Rev Phytopathol 6(1):263–294
- Benhamou N, Rey P, Cherif M, Hockenull 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(1):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(6):506–517
- Benhamou N, Belanger RR, 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 plants. Plant Physiol Biochem 39:681–696
- 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(8):730–740
- Benhamou N, Garand C, Goulet A (2002) Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. Appl Environ Microbiol-SGM 68(8):4044–4060
- 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
- Benitez T, Rincon AM, Limon MC, Codon AC (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Int Microbiol 7(4):249–260
- Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. Curr Opin Plant Biol 4(4):343–350
- Bradshaw-Smith RP, Whalley WM, Craig GD (1991) Interactions between *Pythium oligandrum* and the fungal footrot pathogens of peas. Mycol Res 95:861–865
- Brozova J (2002) Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. Plant Prot Sci 38(1):29–35
- Bull AT (1970) Inhibition of polysaccharases by melanin: enzyme inhibition in relation to mycolysis. Arch Biochem Biophys 137(2):345–356
- Butler EE (1957) *Rhizoctonia solani* as a parasite of fungi. Mycol 49(3):354–373
- Conrath U (2009) Priming of induced plant defense responses. In: Loon LCV (ed) Advances in botanical research. Academic, New York, pp 361–395
- Conrath U, Pieterse CMJ, Mauch-Mani B (2002) Priming in plant-pathogen interactions. Trends Plant Sci 7(5):210–216
- Cooney T, Nonhebel H (1991) Biosynthesis of indole-3-acetic acid in tomato shoots: measurement, mass-spectral identification and incorporation of  $^2\text{H}$  from  $^2\text{H}_2\text{O}$  into indole-3-acetic acid, D- and L-tryptophan, indole-3-pyruvate and tryptamine. Planta 184(3):368–376
- Cother EJ, Gilbert RL (1993) Comparative pathogenicity of *Pythium* species associated with poor seedling establishment of rice in Southern Australia. Plant Pathol 42(2):151–157
- Drechsler C (1930) A new species of *Pythium*. J Wash Acad Sci 20(16):398–418
- Cwalina-Ambroziak B, Nowak M (2012) The effects of biological and chemical controls on fungal communities colonising tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants and soil. Folia Hort 24:13–20
- Edel-Hermann V, Brenot S, Gautheron N, Aime S, Alabouvette C, Steinberg C (2009) Ecological fitness of the biocontrol agent *Fusarium oxysporum* Fo47 in soil and its impact on the soil microbial communities. FEMS Microbiol Ecol 68(1):37–45
- El-Katatny MH, Abdelzاهر HMA, Shoulkamy MA (2006) Antagonistic actions of *Pythium oligandrum* and *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum* and *Pythium ultimum* var. *ultimum*). Arch Phytopathol Plant Prot 39(4):289–301
- Fletcher JT, Smewin BJ, O'Brien A (1990) *Pythium oligandrum* associated with a cropping disorder of *Agaricus bisporus*. Plant Pathol 39(4):603–605
- Foley MF, Deacon JW (1986) Susceptibility of *Pythium* spp. and other fungi to antagonism by the mycoparasite *Pythium oligandrum*. Soil Biol Biochem 18(1):91–95
- Frankenberger WT, Arshad M (1995) Phytohormones in soil: microbial production and function. Marcel Dekker, New York
- Fravel DR (1988) Role of antibiosis in the biocontrol of plant-diseases. Annu Rev Phytopathol 26:75–91
- Fravel D, Olivain C, Alabouvette C (2003) *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. New Phytol 157(3):493–502
- Guetsky R, Shtienberg D, Elad Y, Dinooor A (2001) Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. Phytopathol 91(7):621–627
- Guetsky R, Shtienberg D, Elad Y, Fischer E, Dinooor A (2002) Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. Phytopathol 92(9):976–985
- Haas D, Defago G (2005) Biological control of soil-borne pathogens by *Fluorescent pseudomonads*. Nat Rev Microbiol 4:307–19
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M (2004) *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol 2(1):43–56
- 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(4):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(5):870–876

- He SS, Zhang BX, Ge QX (1992) On the antagonism by hyperparasite *Pythium oligandrum*. Acta Phytopathol Sini 22:77–82
- Helman Y, Burdman S, Okon Y (2011) Plant growth promotion by rhizosphere bacteria through direct effects. In: Rosenberg E, Gophna U (eds) Beneficial microorganisms in multicellular life forms. Springer, Berlin, pp 89–103
- Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E (2012) Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiol 158:17–25
- Horner NR, Grenville-Briggs LJ, Van West P (2012) The oomycete *Pythium oligandrum* expresses putative effectors during mycoparasitism of *Phytophthora infestans* and is amenable to transformation. Fungal Biol 116(1):24–41
- Howell CR (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Dis 87(1):4–10
- Hyakumachi M, Kubota M (2003) Fungi as plant growth promoter and disease suppressor. In: Arora DK, Bridge PD, et al. (eds) Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications. Mycology. CRC, Boca Raton
- 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(3):297–304
- Jeger MJ, Jeffries P, Elad Y, Xu XM (2009) A generic theoretical model for biological control of foliar plant diseases. J Theor Biol 256(2):201–214
- Jones EE, Deacon JW (1995) Mycoparasite-like behaviour of the plant pathogen *Pythium aphanidermatum* in vitro. Plant Pathol 44 (2):396–405
- Jung HW, Tschaplinski TJ, Wang L, Glazebrook J, Greenberg JT (2009) Priming in systemic plant immunity. Sci 324(5923):89–91
- Kawamura Y, Takenaka S, Hase S, Kubota M, Ichinose et al (2009) Enhanced defense responses in *Arabidopsis* induced by the cell wall protein fractions from *Pythium oligandrum* require SGT1, RAR1, NPR1 and JAR1. Plant Cell Physiol 50(5):924–934
- Kilpatrick RA (1968) Seedling reaction of barley, oats and wheat to *Pythium* species. Plant Dis 52:209–212
- Klemmer HW, Nakano RY (1964) Distribution and pathogenicity of *Phytophthora* and *Pythium* in pineapple soils of Hawaii. Plant Dis Rep 48:848–852
- Kobayasi Y, Matsushima T, Takada M, Hagiwara H (1977) Reports of Japanese mycological expedition to Mts Ruwenzori, Central-Africa. Trans Mycol Soc Jpn 18(1):64–94
- Kloepper JW, Zablotowicz RM, Tipping EM, Lifshitz R (1991) Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: Keister DL, Cregan PB (eds) The rhizosphere and plant growth. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 315–326
- Kratka J, Bergmanova E, Kudelova A (1994) Effect of *Pythium oligandrum* and *Pythium ultimum* on biochemical-changes in cucumber (*Cucumis-Sativus L*). J Plant Dis Prot 101(4):406–413
- 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(5–6):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(2):459–470
- Le Floch G, Benhamou N, Mamaca E, Salerno MI, 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):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(2):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(3):288–298
- Lherminier J, Benhamou N, Larrue J, Milat ML, Boudon-Padieu E, Nicole M, Blein JP (2003) Cytological characterization of elicitor-induced protection in tobacco plants infected by *Phytophthora parasitica* or phytoplasma. Phytopathol 93(10):1308–1319
- Lifshitz R, Kloepper JW, Kozlowski M, Simonson C, Carlson J, Tipping EM, Zaleska I (1987) Growth promotion of canola (Rape seed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. Can J Microbiol 33(5):390–395
- Liu SD, Baker R (1980) Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. Phytopathol 70(5):404–412
- Lou BG, Wang AY, Lin C, Xu T, Zheng XD (2011) Enhancement of defense responses by oligandrin against *Botrytis cinerea* in tomatoes. Afr J Biotechnol 10(55):442–449
- Louvet J, Rouxel F, Alabouvette C (1976) Recherches sur la résistance des sols aux maladies, mise en évidence de la nature microbiologique de la résistance d'un sol au développement de la fusariose vasculaire du melon. Ann Phytopathol 8:425–436
- Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annu Rev Microbiol 63:541–566
- Madsen AM, de Neergaard E (1999) Interactions between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and sclerotia of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. Eur J Plant Pathol 105(8):761–768
- Mallik MAB, Williams RD (2008) Plant growth promoting rhizobacteria and mycorrhizal fungi in sustainable agriculture and forestry. Sanashui, China
- Martin FN, Hancock JG (1986) Association of chemical and biological factors in soils suppressive to *Pythium ultimum*. Phytopathol 76 (11):1221–1231
- Martin FN, Hancock JG (1987) The Use of *Pythium oligandrum* for biological control of pre-emergence damping-off caused by *Pythium ultimum*. Phytopathol 77(7):1013–1020
- 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(4):281–287
- Masunaka A, Sekiguchi H, Takahashi H, Takenaka S (2010) Distribution and expression of elicitin-like protein genes of the biocontrol agent *Pythium oligandrum*. J Phytopathol 158(6):417–426
- McQuilken MP, Whipps JM, Cooke RC (1990) Control of damping-off in cress and sugar beet by commercial seed-coating with *Pythium oligandrum*. Plant Pathol 39(3):452–462
- McQuilken MP, Whipps JM, Cooke RC (1992) Use of oospore formulations of *Pythium oligandrum* for biological control of *Pythium* damping-off in cress. J Phytopathol 135(2):125–134
- McQuilken MP, Powell HG, Budge SP, Whipps JM (1998) Effect of storage on the survival and biocontrol activity of *Pythium oligandrum* in pelleted sugar beet seed. Biocontrol Sci Technol 8 (2):237–241
- Meszka B, Bielenin A (2010) Polyversum WP a new biological product against strawberry grey mould. Phytopathol 58:13–19
- Mohamed N, Lherminier J, Farmer MJ, Fromentin J, Beno N, Houot V, Milat ML, Blein JP (2007) Defense responses in grapevine leaves against *Botrytis cinerea* induced by application of a *Pythium oligandrum* strain or its elicitin, oligandrin, to roots. Phytopathol 97(5):611–620
- Mulligan DFC, Deacon JW (1992) Detection of presumptive mycoparasites in soil placed on host-colonized agar plates. Mycol Res 96:605–608
- Olivain C, Alabouvette C (1997) Colonization of tomato root by a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. New Phytol 137(3):481–494

- Olivain C, Alabouvette C (1999) Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain. *New Phytol* 141 (3):497–510
- Olivain C, Humbert C, Nahalkova J, Fatehi J, L'Haridon F, Alabouvette C (2006) Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. *Appl Environ Microbiol* 72 (2):1523–1531
- Picard K, Tirilly Y, Benhamou N (2000a) Cytological effects of cellulases in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. *Appl Environ Microbiol* 66(10):4305–4314
- Picard K, Ponchet M, Blein JP, 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(1):379–395
- Plaats-Niterink AJVd (1981) Monograph of the genus *Pythium*. Baarn, Netherlands
- Ponchet M, Panabieres F, Milat ML, Mikes V, Montillet JL, Suty L, Triantaphylides C, Tirilly Y, Blein JP (1999) Are elicitors cryptograms in plant–oomycete communications? *Cell Mol Life Sci* 56 (11–12):1020–1047
- Rekanovic E, Milijasevic S, Todorovic B, Potocnik I (2007) Possibilities of biological and chemical control of *Verticillium wilt* in pepper. *Phytoparasit* 35(5):436–441
- Rey P, Benhamou N, Tirilly Y (1996) Ultrastructural and cytochemical studies of cucumber roots infected by two *Pythium* species with different modes of pathogenicity. *Physiol Mol Plant Pathol* 49 (4):213–231
- 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
- Rey P, Benhamou N, Tirilly Y (1998b) Ultrastructural and cytochemical investigation of asymptomatic infection by *Pythium* spp. *Phytopathol* 88(3):234–244
- Rey P, Picard K, Déniel F, Benhamou N, Tirilly Y (1999) Development of an IPM system in soilless culture by using slow filtration and a biocontrol fungus, *Pythium oligandrum*. In: Van Lenteren JC (ed) Integrated control in glasshouses, IOBC WPRS Bulletin, pp 205–208
- Rey P, Le Floch G, Benhamou N, Salerno MI, Thuillier E, Tirilly Y (2005) Interactions between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and two types of sclerotia of plant-pathogenic fungi. *Mycol Res* 109:779–788
- 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
- Ribeiro WRC, Butler EE (1992) Isolation of mycoparasitic species of *Pythium* with spiny oogonia from soil in California. *Mycol Res* 96:857–862
- Rouxel F, Alabouvette C, Louvet J (1979) Recherches sur la résistance des sols aux maladies IV-Mise en évidence du rôle des *Fusarium* autochtones dans la résistance d'un sol à la Fusariose vasculaire du Melon. *Ann Phytopathol* 11:199–207, French
- Rybicka H (1981) Tryptophan in root exudate of mock orange and tomato. *Acta Physiol Plant* 3:95–98
- Savazzini F, Longa CMO, Pertot I (2009) Impact of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 on soil microbial communities of a vineyard in northern Italy. *Soil Biol Biochem* 41(7):1457–1465
- Schmitthener AF (1962) Isolation of *Pythium* from soil particles. *Phytopathol* 52:1133–1138
- Sharma RR, Singh D, Singh R (2009) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biol Control* 50(3):205–221
- Taiz L, Zeiger E (1998) Auxins. In: Taiz L, Zeiger E (eds) Plant physiology. Sinauer Associates, Sunderland, pp 543–589
- 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(10):1228–1232
- 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(5):325–339
- 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. *Phytopathol* 98(2):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(5):340–348
- Takenaka S, Ishikawa S (2013) Biocontrol of sugar beet seedling and taproot diseases caused by *Aphanomyces cochlioides* by *Pythium oligandrum* treatments before transplanting. *Jpn Agric Res Quarter* 47(1):75–83
- Vaartaja O, Bumbieris M (1964) Abundance of *Pythium* species in nursery soils in South Australia. *Aust J Biol Sci* 17:436–445
- Vallance J, Le Floch G, Deniel F, Barbier G, Levesque CA, Rey P (2009) Influence of *Pythium oligandrum* biocontrol on fungal and oomycete population dynamics in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 75(14):4790–4800
- 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(9):1124–1134
- Veloso J, Diaz J (2012) *Fusarium oxysporum* Fo47 confers protection to pepper plants against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora capsici*, and induces the expression of defence genes. *Plant Pathol* 61(2):281–288
- Weaver M, Vedenyapina E, Kenerley CM (2005) Fitness, persistence, and responsiveness of a genetically engineered strain of *Trichoderma virens* in soil mesocosms. *Appl Soil Ecol* 29(2):125–134
- Whipps JM, McQuilken MP (2001) Biocontrol activity of *Pythium oligandrum* and *Coniothyrium minitans* in pelleted and film-coated seed. Seed treatment: challenges & opportunities. BCPIC Symposium Proceedings No. 76, pp 127–134
- Wright JM (1956) The production of antibiotics in soil. *Ann Appl Biol* 44(3):461–466
- Wulff EG, Pham ATH, 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(1):69–76
- Xu XM, Salama N, Jeffries P, Jeger MJ (2010) Numerical studies of biocontrol efficacies of foliar plant pathogens in relation to the characteristics of a biocontrol agent. *Phytopathol* 100 (8):814–821
- Xu XM, Jeffries P, Pautasso M, Jeger MJ (2011a) A numerical study of combined use of two biocontrol agents with different biocontrol mechanisms in controlling foliar pathogens. *Phytopathol* 101 (9):1032–1044
- Xu XM, Jeffries P, Pautasso M, Jeger MJ (2011b) Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathol* 101(9):1024–1031
- Yedidia I, Benhamou N, Chet I (1999) Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol* 65(3):1061–1070

## **Principales conclusions de la publication**

Cette publication sur les avantages et les limites de l'utilisation de micro-organismes de biocontrôle, vu sous l'angle de l'oomycète *P. oligandrum*, souligne les principaux points à prendre en considération afin d'assurer une protection stable et efficace des cultures. Pour coloniser et persister dans la rhizosphère, l'oomycète doit s'adapter à des facteurs abiotiques, par exemple aux propriétés physico-chimiques du sol, mais aussi aux facteurs biotiques tels que la plante hôte, les communautés microbiennes et les agents phytopathogènes en concurrence.

L'étude des interactions avec ces différents éléments est aujourd'hui possible et commence à apporter des informations précieuses sur leur devenir dans un agrosystème. Ainsi, l'un des principaux avantages de l'utilisation des agents de lutte biologique provient de la faible incidence qu'ils ont sur la biodiversité de la microflore indigène. L'impact des stratégies de lutte biologique à long terme devra cependant être étudié afin d'anticiper les éventuels effets négatifs sur l'environnement.

Le fort développement, ces dernières années, des méthodes d'analyses transcriptomiques, telles que les microarrays, devrait significativement améliorer la prospection et l'identification de potentiels agents de biocontrôle, l'élucidation de leurs modes d'action, leurs suivis au niveau de l'installation sur la plante et leurs activités après application au champ. Ces évolutions ouvriront de nouvelles possibilités en terme de stratégies de protection des cultures qui deviendront beaucoup plus précises, respectueuses de l'environnement et efficaces.

Dans le cadre de cette thèse, l'action de protection exercée par l'oomycète *P. oligandrum* se fait principalement par activation des systèmes de défense de la plante. Pour cette raison, le paragraphe 3 sera consacré à la description générale de ces systèmes chez les végétaux.

## **3- Les systèmes de défense chez les végétaux**

Dans l'environnement, de nombreux micro-organismes colonisent les végétaux. Certains d'entre eux ayant des propriétés d'agents phytopathogènes, peuvent exercer des agressions plus ou moins fortes. Afin de se défendre, les plantes ont développé des mécanismes complexes impliquant des défenses dites constitutives et également des défenses induites. Le système de défense constitutif correspond par exemple aux barrières physiques préexistantes qui limitent l'entrée et la progression du pathogène dans la plante

(cuticule, cutine, parois, etc.) et par plusieurs composés antimicrobiens (certaines molécules phénoliques, etc.) naturellement présents en l'absence de stress (Wittstock et Gershenzon, 2002). La deuxième ligne de défense est plus complexe, la résistance est dite « induites », un dialogue moléculaire s'établissant entre l'agent pathogène et la plante. Au final, des mécanismes de défenses, non préexistants, vont se mettre en place et ils permettront de confiner l'agent pathogène au site d'infection. Pour décrire ce dialogue, un modèle de relation gène pour gène a été proposé par Flor en 1971. Lorsque les mécanismes de défenses sont contournés par l'agent pathogène, la plante devient sensible et la maladie va se développer : l'interaction est qualifiée de compatible. Dans le cas contraire, l'interaction est incompatible, la plante active rapidement ses défenses et développe une résistance contre l'agression. Trois processus sont généralement décrits lors de la mise en place des défenses induites:

- (1) la perception du stress,
- (2) la signalisation (intracellulaire puis intercellulaire) et
- (3) les réponses de défense de la plante (Walters *et al.* 2007).

Ces réactions se distinguent selon la rapidité et la localisation des mécanismes de défense mis en place lors de l'interaction plante / agent pathogène. Trois d'entre elles sont répertoriées :

- ✓ la réponse dite d'hypersensibilité (HR), similaire au processus de mort cellulaire programmée (apoptose), elle déclenche des nécroses cellulaires et confine l'agent pathogène au niveau du site d'infection.
- ✓ L'observation d'une résistance induite au niveau du site d'infection et/ou des cellules proximales suite à des modifications métaboliques correspond à la résistance locale induite (Local Acquired Resistance, LAR).
- ✓ Lorsque la LAR se généralise à la plante entière, la résistance induite se nomme résistance systémique acquise (Systemic Acquired Resistance, SAR).

### 3.1 La perception de l'agent pathogène

La mise en place des mécanismes de résistance chez la plante est toujours initiée par la perception d'un signal qui va déclencher les réactions de défense. Ces signaux désignés par le terme d'éliciteurs sont d'origine exogène lorsqu'ils proviennent du pathogène ou endogène lorsqu'ils sont produits par le végétal (Angelova *et al.* 2006). Leurs natures sont très variées, ce sont par exemple des oligosaccharides (*e.g.* oligomères de chitine,  $\beta$ -glucanes, chitosane), des glycoprotéines (*e.g.* les élicitines) ou des lipides (*e.g.* ergostérol,

phospholipides) (Lyon 2007). La reconnaissance par la plante de ces éliciteurs conduit à deux types d'immunité : primaire ou secondaire. Elles ne sont pas opposées mais résultent du processus de coévolution plante-pathogène (Thompson 1999).

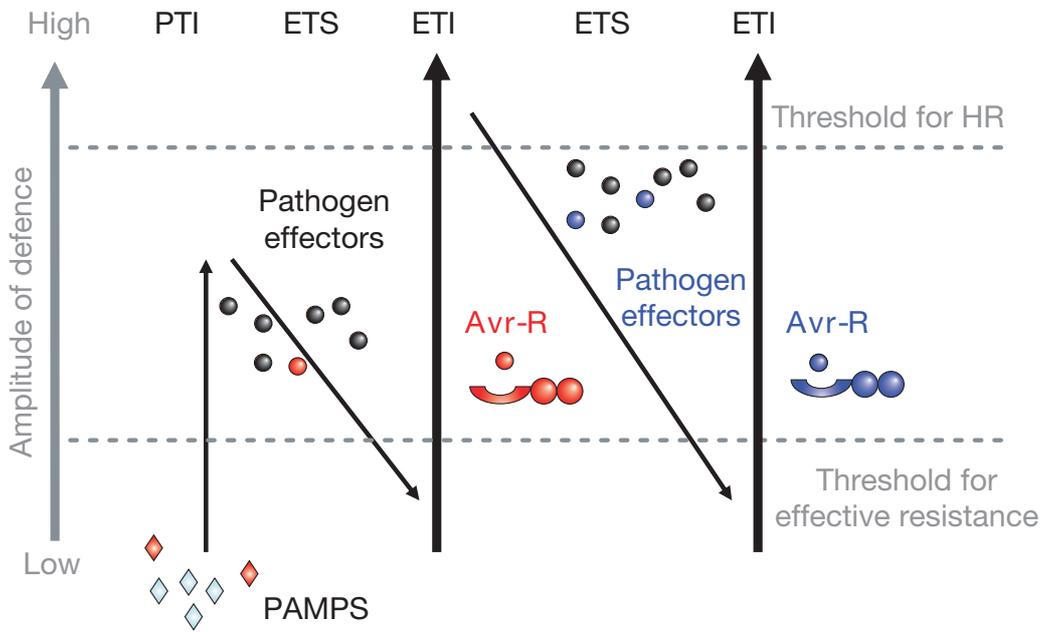


Figure 1 Représentation du modèle en ZigZag de l'évolution du système immunitaire chez les plantes par pression de sélection exercée par les agents pathogènes (extrait de Jones et Dangl 2006).

Ce phénomène a été modélisé en plusieurs phases par Jones et Dangl en 2006:

Phase 1 : les éliciteurs généraux des agents pathogènes sont reconnus par la plante (MAMPs/ PAMPs, Microbial/Pathogen-Associated Molecular Patterns) via les récepteurs de type PRR (Pattern-Recognition Receptor) qui déclenchent les mécanismes de défense (PTI, PAMP-Triggered Immunity). Ce premier niveau correspond à la réponse immunitaire primaire.

Phase 2 : l'agent pathogène contourne ces défenses en libérant des effecteurs qui vont interférer avec la première barrière de défense PTI. La plante devient sensible (ETS- Effector-Triggered Immunity).

Phase 3 : l'un des effecteurs (en rouge) est reconnu par un gène de résistance de l'hôte activant l'ETI- Effector-Triggered Immunity. Ce deuxième niveau de reconnaissance correspond à la réponse immunitaire secondaire qui conduit souvent à une réponse d'hyper-sensibilité HR.

Phase 4 : via la sélection naturelle, les isolats qui ont perdu les effecteurs de la phase 3 (rouges) et/ou gagné des nouveaux effecteurs sont de nouveau capables de supprimer l'ETI. La sélection de nouvelles plantes avec de nouveaux gènes de résistance permettra l'ETI.

#### *La résistance basale PTI (PAMP-Triggered Immunity) ou immunité primaire :*

Les éliciteurs généraux des agents pathogènes appelés Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) peuvent être reconnus par les Pattern Recognition Receptors (PRRs) de la plante. Cette reconnaissance conduit à l'induction de l'immunité primaire ou résistance basale (PAMP Triggered Immunity, PTI) (Boller et Felix 2009 ; Jones et Dangl

2006). Des structures similaires aux PAMPs existent chez les micro-organismes non pathogènes. Dans ce cas le terme Microbe Associated Molecular Pattern (MAMP) est utilisé. Certains produits de dégradation de la paroi des plantes (e.g. cellulose ou monomères de cutine) appelés Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs) peuvent initier la PTI (Postel et Kemmerling 2009).

*La résistance race-spécifique ETI ou immunité secondaire :*

Certains agents pathogènes sécrètent des effecteurs inactivant les PRRs pour contourner la première ligne de défense basale (i.e. la PTI). Ils permettent la colonisation des cellules de l'hôte (Hogenhout *et al.* 2009). Lorsque la plante reconnaît les effecteurs, l'immunité secondaire, ou Effector-Triggered-Immunity (ETI), est activée; la résistance est alors rétablie (Boller et Felix 2009 ; Jones et Dangl 2006). Cette immunité secondaire nécessite l'adaptation de la plante aux nouvelles techniques d'attaque mises en place par l'agent pathogène.

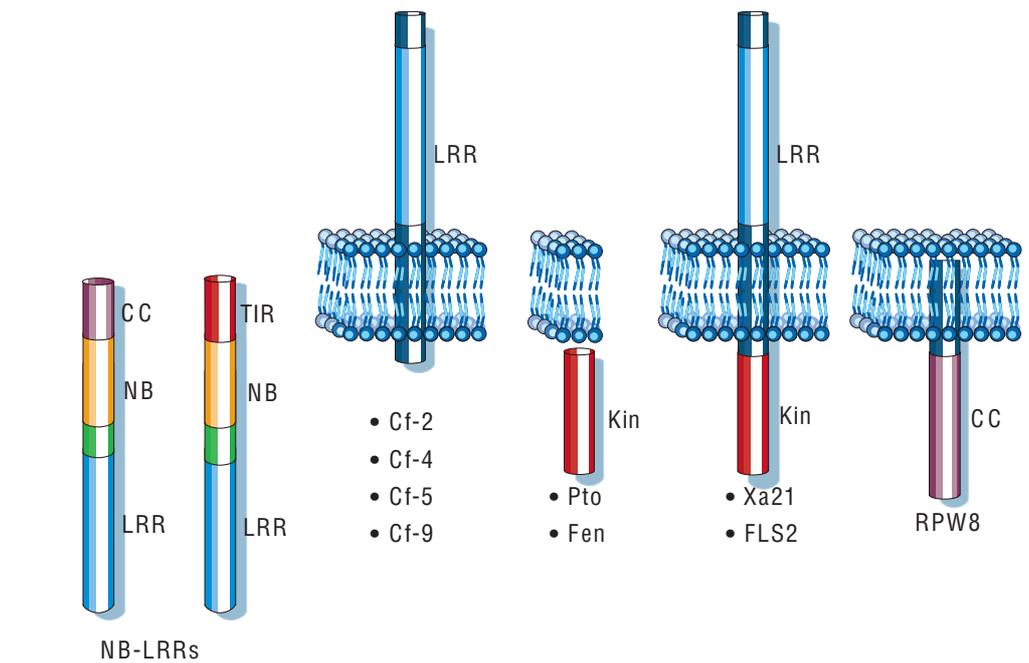


Figure 2 Représentation de la localisation et de la structure des cinq classes principales de protéines impliquées dans l'ETI (d'après Dangl et Jones, 2001). TIR, Toll Interleukine Receptor ; CC, Coiled Coil; NB, Nucleotide Binding ; LRR: Leucine Rich Repeat

Le cas de la résistance spécifique (reconnaissance d'un biotype de l'agent pathogène par un cultivar de la plante hôte) gène pour gène décrit par Flor (1956) est un cas particulier de l'ETI. En effet, elle résulte de la reconnaissance entre deux gènes dominants : un gène du pathogène dit d'avirulence (Avr) et un gène de la plante dit de résistance (R).

Les R gènes (figure 4) impliqués dans l'ETI peuvent être localisés à la surface de la cellule (Nürnberger et Brunner 2002). La majorité de ces gènes appartient à la famille des NB-LRR (Leucine Rich Repeat) caractérisée par un domaine riche en leucine, un domaine NB (Nucleotide Binding site) qui se lie à l'ADN et un domaine variable qui a des propriétés communes avec le récepteur Toll-Interleukine-1 (TIR, toll/interleukine-1 receptor) de la drosophile ou un motif Coiled-coil (CC) des facteurs d'élongation des mammifères (Dangl et Jones 2001 ; Dry *et al.* 2010).

La formation du complexe va déclencher une cascade d'événements qui conduira à la résistance de la plante le plus souvent grâce à la mise en œuvre d'une réaction d'hypersensibilité HR (Heath 2000).

### 3.2 La transduction du signal

Après la reconnaissance de l'agent pathogène par la plante, des réactions rapides de transduction du signal se mettent en place dans les cellules agressées. Ceci intervient tout d'abord au niveau intracellulaire puis ensuite au niveau intercellulaire.

Les voies de signalisation intracellulaires

Les réponses cellulaires précoces les plus fréquentes sont des mécanismes de modification de flux ioniques, de production de formes actives d'oxygène et des mécanismes de phosphorylation / déphosphorylation (Zhao *et al.* 2005).

- *Les flux ioniques*

Suite à la reconnaissance d'un éliciteur, les réponses les plus précoces se situent au niveau de la membrane plasmique où des modifications de perméabilité vont provoquer des échanges d'ions entre les milieux intra et extracellulaires. De nombreux modèles rapportent un influx de  $Ca^{2+}$ , un efflux de  $NO_3^-$  et  $Cl^-$  un échange de  $K^+/H^+$ , en réponse à des éliciteurs chez la plante, *i.e.* chez *Arabidopsis thaliana*, le persil, le tabac (Jabs *et al.* 1997 ; Nürnberger *et al.* 1994 ; Wendehenne *et al.* 2002). L'influx de  $H^+$  provoque une alcalinisation du milieu extracellulaire qui est toxique pour les agents pathogènes (Gerber et Durbery 2004).

- *La production de Formes Actives de l'Oxygène (FAO)*

Les FAO sont essentiellement représentées par l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), le radical hydroperoxyde ( $HO_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui est la forme la plus stable et le radical hydroxyde ( $OH^\cdot$ ) (Lamb et Dixon 1997; Torres *et al.* 2006). Lors de l'interaction entre la plante et l'agent pathogène, ces composés oxygénés vont s'accumuler et créer un « burst oxydatif » (Mittler *et al.* 2004). La FAO la plus étudiée est le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Cette molécule est capable d'induire l'expression de nombreux gènes de défense (Aziz *et al.* 2004 ; Mehdy 1994 ; Tenhaken *et al.* 1995) et elle est impliquée dans le renforcement des parois du végétal (Bradley *et al.* 1992). L' $H_2O_2$  est également susceptible d'inhiber directement la germination des spores de nombreux agents pathogènes (Low et Merida, 1996). Le « burst oxydatif » est impliqué dans la mise en place de la RH et dans l'activation des Mitogen-Activated-Protein-Kinases (MAPKs).

- *La voie de transduction des MAP Kinases*

Cette voie se caractérise par des cascades successives d'activation de kinases comme les MAPKs après la perception d'un agent pathogène (Zhang et Kesslig, 2001). Elles permettent d'acheminer le signal depuis la surface des cellules jusqu'au noyau. La MAP kinase (MAPK) est activée par une MAPK kinase (MAPKK), qui est activée à son tour par une MAPKK kinase (MAPKKK). L'activation ou l'inactivation de ces protéines kinases sont réalisées par phosphorylation ou déphosphorylation. La MAPK activée influence divers phénomènes : la production de 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).

Ces trois premiers mécanismes sont activés dès les premières minutes après la perception d'un stress, dans le but de détruire l'agent pathogène ou de limiter sa progression dans la plante (Dangl et Jones 2001). D'autres molécules, les phytohormones, interviennent dans la signalisation intercellulaire pour permettre la généralisation des réponses de défense à la plante entière, au moment de la mise en place de la SAR.

### La signalisation intercellulaire

La transduction intercellulaire assure la communication entre les cellules infectées et les cellules saines. Cette communication est principalement réalisée grâce à trois phytohormones, l'acide jasmonique (JA), l'acide salicylique (SA) et l'éthylène (ET) (Bari et Jones 2009 ; Kachroo et Kachroo 2007). Des études récentes indiquent que d'autres hormones comme l'acide abscissique (ABA), l'auxine, l'acide gibbéréllique (GA), les cytokines (CK), les brassinostéroïdes (BR) et les hormones peptidiques sont également impliqués dans les voies de signalisation des mécanismes de défense des végétaux, mais

leurs rôles dans la défense des plantes est moins étudié (Bari et Jones 2009). Les trois principales phytohormones seront présentées.

- *L'acide salicylique (SA)*

L'acide salicylique est un composé phénolique obtenu lors de la conversion de la phénylalanine en acide trans-cinnamique par action enzymatique de la phénylalanine ammonialyase (PAL) ou par la voie de l'isochorismate. L'acide salicylique est une molécule signal importante impliquée dans la résistance locale (LAR) ou systémique (SAR) (Mauch-Mani et Métraux 1998) en stimulant l'expression de certains gènes codant pour les protéines PR (Pathogenesis Related) (Ryals *et al.* 1996).

- *L'éthylène (ET)*

L'éthylène est une phytohormone dérivée de la méthionine via l'acide 1-aminocyclopropane-1 carboxylique (ACC) par action enzymatique de l'ACC synthase. La voie de l'éthylène est impliquée dans la stimulation des protéines PR (Martinez *et al.* 2001) et de la production de composés antifongiques (Graham et Sticklen 1994).

- *L'acide jasmonique (JA)*

L'acide jasmonique appartient à la famille des oxylipines et dérive d'un acide gras, l'acide linoléique, par l'action de la lipoxygénase (LOX13) (Turner *et al.* 2002). Suite à une attaque par un agent pathogène nécrotrophe, cette molécule, ainsi que son dérivé le méthyl-jasmonate (MeJa) peuvent agir comme des éliciteurs, capables d'induire l'accumulation de métabolites secondaires (phytoalexines) et de protéines PR (Faurie *et al.* 2009).

Les interactions entre les voies de signalisation sont complexes et peuvent interagir positivement ou négativement (figure 5). Selon l'infection, différentes voies seront favorisées. Ainsi, l'infection par un agent biotrophe provoque principalement une activation de la voie de l'AS. Au contraire, l'infection par un agent pathogène nécrotrophe induit l'AJ et/ou l'ET (Thomma *et al.* 1999). Les modifications métaboliques moléculaires et cellulaires de la plante vont donner différents types de réponses.

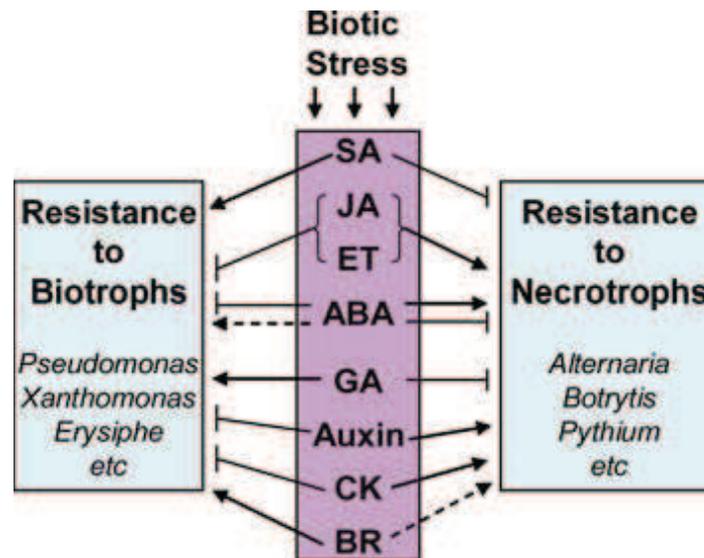


Figure 3 Modèle simplifié de l'implication de différentes hormones dans la régulation positive ou négative de la résistance des plantes aux micro-organismes biotrophes et nécrotrophes. Les flèches indiquent l'activation ou l'interaction positive et les lignes bloquées, la répression ou une interaction négative (Bari et Jones 2009)

### 3.3 Les réponses de défense chez la plante

La transduction d'un signal établie après la perception d'un agent pathogène conduit à une reprogrammation de l'expression des gènes de la plante pour mettre en place les réponses de défense adaptées. Elles sont de 3 ordres : (1) le renforcement des parois pectocellulosiques, (2) la synthèse de métabolites secondaires et de (3) protéines PR.

#### (1) Le renforcement des parois pectocellulosiques

Il se fait par l'accumulation de différentes substances :

- de glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP) (Cheong *et al.* 2002), en glycine ou en proline.

- de la callose (polymère de  $\beta$ -1-3-glucanes), dont la synthèse est assurée par une enzyme membranaire (la callose synthase, CALS), au niveau et autour du site d'infection pour former les papilles ( Hui *et al.* 2003).

- de la lignine qui permet la lignification des papilles et protège d'une infection ultérieure. Les unités de base du polymère lignine résultent 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).

## (2) Les métabolites secondaires

Certaines voies métaboliques secondaires sont stimulées et induisent la synthèse de composés qui inhiberont ou bloqueront le pathogène au site d'infection (Raynal *et al.* 1980). Ces métabolites secondaires sont principalement représentés par les phytoalexines, molécules de faibles poids moléculaires possédant des activités antimicrobiennes. Elles sont secrétées en réponse à un éliciteur biotique ou abiotique et s'accumulent rapidement autour du site de nécrose (Kuc *et al.* 1995). Il existe 4 familles de phytoalexines (figure 6): les phénylpropanoïdes, les terpénoïdes, les polykétides et les indoles soufrés.

Pour les phénylpropanoïdes et les indoles, la molécule de départ de leur biosynthèse est le chorismate, qui dérive du shikimate sous l'action de la chorismate synthase (CHORS). Pour la voie des phénylpropanoïdes, le chorismate se transforme en phénylalanine sous l'action de la chorismate mutase (CHORM), alors que pour la voie des indoles, le chorismate se transforme en tryptophane sous l'action de l'antranilate synthase (ANTS).

La plupart des phytoalexines appartiennent à la famille des phénylpropanoïdes, *i.e.* les flavonoïdes, isoflavonoïdes, stilbènes et coumarines. L'ensemble des composés phénylpropanoïdes dérive de l'acide t-cinnamique, la première molécule, le phénylpropane est formée à partir de la phénylalanine grâce à l'action de la PAL. Cette enzyme clé de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes constitue le point de branchement entre le métabolisme primaire du shikimate qui conduit aux acides aminés aromatiques, et le métabolisme secondaire des phénylpropanoïdes. La synthèse d'un grand nombre de phénylpropanoïdes débute par la condensation du p-coumaroyl-CoA et de trois molécules de malonyl-CoA (figure 6). Le produit de cette réaction catalysée par la chalcone synthase (CHS) puis la chalcone isomérase (CHI) va conduire à un ensemble de molécules aux propriétés antioxydantes et anti-microbiennes, appartenant à la famille des flavonoïdes. Par exemple, les quercétines ou encore l'épicatéchine qui sont catalysées par la leucoanthocyanidine dioxygénase (LDOX) et l'anthocyanidine réductase (BAN) font partie de cette famille de molécules anti-microbiennes.

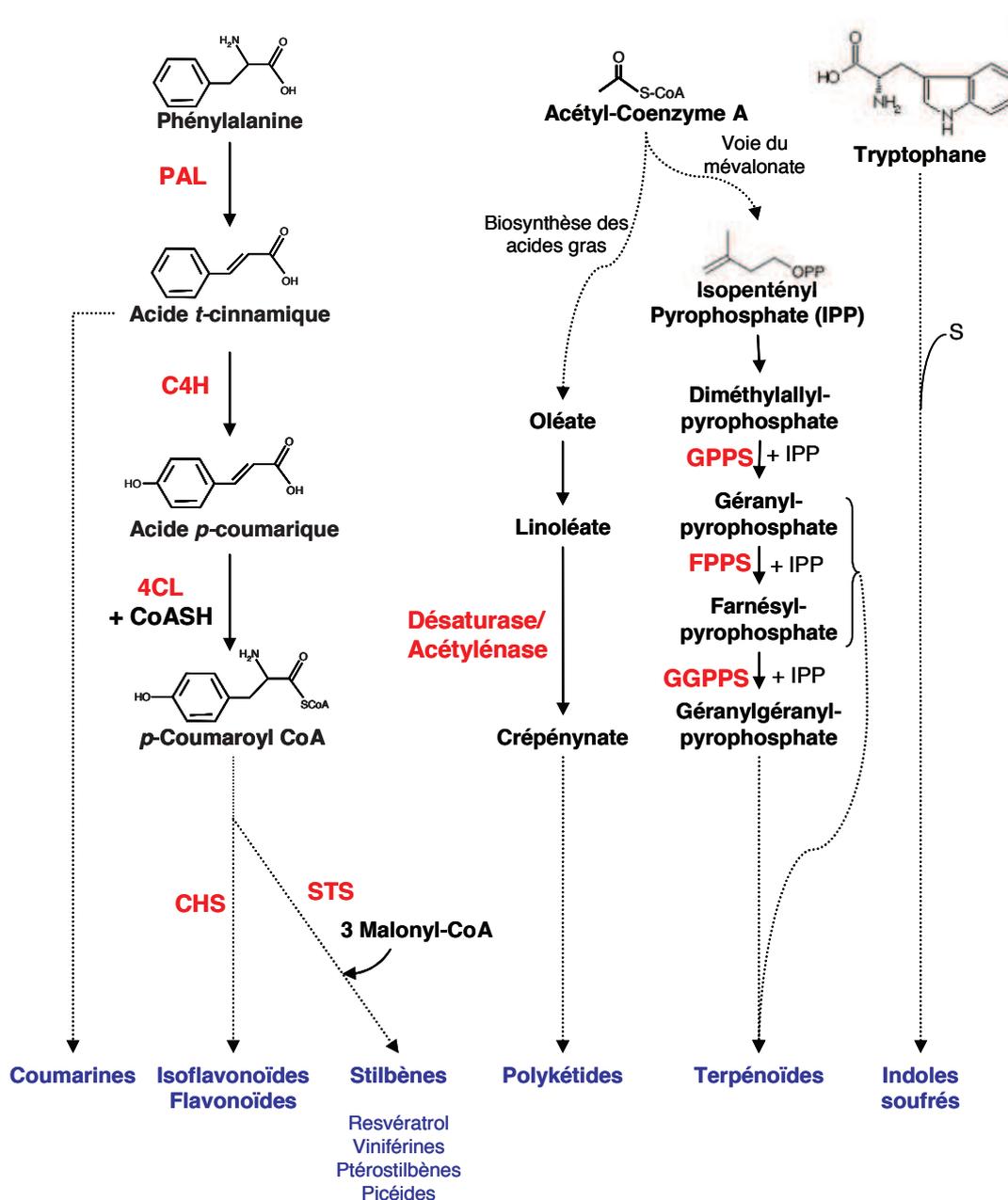


Figure 4 Voies simplifiées de biosynthèse des phytoalexines. PAL : phénylalanine amonia-lyase ; C4H : cinnamate-4-hydroxylase ; 4CL : 4-coumarate:CoA ligase ; STS : stilbène synthase ; CHS : chalcone synthase ; GPPS : géranylpyrophosphate synthase ; FPPS : farnésylpyrophosphate synthase. Les flèches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

Certaines espèces végétales, codent également pour la stilbène synthase (STS) qui utilise les mêmes substrats que la CHS et conduit à la synthèse des stilbènes, composés aux propriétés anti-oxydantes ou anti-microbiennes, tel que le resvératrol. Chez la vigne, les principales phytoalexines accumulées en réponse à un stress biotique ou abiotique semblent être des stilbènes, e.g. le trans-resvératrol, les viniférines, les picéides et les ptérostilbènes.

Des métabolites secondaires, qui dérivent des acides gras, peuvent aussi avoir un rôle dans les défenses de la plante : c'est le cas des oxylipines. Ce sont des composés oxygénés qui sont formés à partir des lipides membranaires (acides gras poly-insaturés) sous l'action de la lipoxygénase (9-LOX) (Vollenweider *et al.* 2000). Ces molécules ont un effet antimicrobien et interviennent dans la régulation de la mort cellulaire (Prost *et al.* 2005).

### (3) Les protéines PR (*Pathogenesis Related*)

Les protéines PR constituent un groupe important de protéines très stables en milieu acide et résistantes aux protéases. Elles s'accumulent dans la plante lors d'une infection par un agent pathogène (bactéries, champignons, virus), notamment lors des réactions de type HR et SAR. Ces protéines sont absentes dans les plantes saines et présentent des activités antimicrobiennes.

Cette appellation leur a été donnée dès 1980 alors que leur fonction était inconnue (Antoniw *et al.* 1980). Elles ont été réparties en plusieurs familles selon leur structure et leur fonction. D'après la classification de Van Loon et Van Sterien (1999), il existe aujourd'hui, 17 familles de PR. Certaines protéines PR ont une activité chitinase (PR-3, PR-4, PR-8, PR11) ou glucanase (PR-2), ce qui leur permet de dégrader la paroi de nombreux champignons pathogènes (Mauch *et al.* 1988). La PR-5 a des propriétés de type osmotines qui sont des régulateurs de la pression osmotique. L'induction de protéines inhibitrices de protéases PR-6 (PIN) ou de polygalacturonases (PGIP) microbiennes a également été mise en évidence en réponses aux agents pathogènes (Cordero *et al.* 1994) (tableau 4).

La connaissance du fonctionnement des systèmes de défense chez les végétaux ouvre des perspectives aux stratégies de protection basée sur la stimulation des défenses des plantes via l'utilisation de microorganismes ou de molécules naturelles ou de synthèse. La gestion de la résistance induite, en combinaison avec d'autres méthodes complémentaires (chimiques, génétiques, culturales, etc.) contribuera à la diminution du recours aux pesticides conventionnels à fort impact sur l'environnement (Pajot et Regnault-Roger 2008).

Tableau 4 Familles de protéines PR (d'après 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	$\beta$ -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

## 4- Conclusion

La viticulture, à travers son histoire, occupe une place importante dans l'agriculture, l'économie et la culture française. La production de raisin de qualité nécessite cependant l'utilisation importante de pesticides chimiques de synthèse pour lutter contre les infections causées par de nombreux bioagresseurs. Ces traitements fréquents posent le problème de leur impact sur la santé humaine, l'environnement et également celui de la présence de résidus de pesticides dans le vin.

Malgré cette utilisation intensive, la pérennité de la vigne ne semble pas assurée. En effet, il a été exposé dans ce premier chapitre que la vigne est atteinte par l'esca, une maladie de dépérissement qui dégrade le bois des ceps. L'épidémie en cours se répand et progresse au fur et à mesure du temps dans le vignoble français. Aucun produit phytosanitaire n'est actuellement homologué contre l'esca, cette pathologie devient, en ce début de 21<sup>ème</sup> siècle, une source d'inquiétude majeure pour la profession viticole.

Dans ce contexte, le biocontrôle par utilisation de micro-organismes peut être une stratégie de protection pertinente, un de ses avantages étant son faible impact sur l'environnement.

La revue bibliographique a montré que certains points doivent pourtant être vérifiés afin de réaliser une protection biologique efficace. Il est ainsi nécessaire de prendre en compte les facteurs biotiques et abiotiques qui agissent sur l'agrosystème ceci afin d'assurer la colonisation durable du végétal par l'agent de biocontrôle. L'efficacité du biocontrôle étant souvent variable en plein champ, une bonne connaissance de la relation établie entre l'agent de protection microbien et la plante à protéger est une nécessité.

Lors des travaux de thèse, le principal intérêt de l'oomycète que nous avons utilisé, *P. oligandrum*, est la multiplicité de ses modes d'action, sa capacité à coloniser de nombreuses plantes et son large spectre d'action contre les micro-organismes phytopathogènes.

A partir de cet état de l'art nous pouvons définir les objectifs des travaux de thèse.



# 2

## Chapitre

# Objectifs et démarche

### Objectifs

L'étude bibliographique présentée dans le chapitre précédent montre l'importance historique et économique de la filière viticole. Elle met aussi en évidence le paradoxe entre, d'une part le recours intensif aux produits phytosanitaires de synthèse pour lutter contre certains bio-agresseurs de la vigne, principalement l'oïdium et le mildiou et, d'autre part, les maladies du bois de la vigne, particulièrement l'esca, pour laquelle il n'existe aucun traitement préventif ou curatif. En effet, depuis l'interdiction en 2001 de l'arsénite de sodium, les viticulteurs sont devant une impasse phytosanitaire pour lutter contre cette pathologie. Actuellement, le développement de produits phytosanitaires de synthèse contre l'esca semble également peu vraisemblable, car au-delà de l'impact négatif des traitements phytosanitaires sur les écosystèmes, aucun essai n'apporte une protection importante contre l'esca. La recherche de méthodes de protection alternatives devient donc une priorité. Dans la présente thèse, nous proposons d'évaluer la capacité d'un oomycète, *P. oligandrum*, à établir une relation durable avec la plante afin de stimuler ses mécanismes de défense suite à une attaque par un agent phytopathogène impliqué dans l'esca, *Phaeomoniella chlamydospora*. La question centrale est donc : *P. oligandrum* est-il un micro-organisme capable d'exercer une activité de biocontrôle contre l'esca de la vigne ?

Notre choix s'est porté sur l'espèce *P. oligandrum* pour plusieurs raisons, (1) les travaux scientifiques rapportant son efficacité en tant qu'agent de biocontrôle sont abondants (Benhamou *et al.* 1997 ; Le Floch *et al.* 2005; Rey *et al.* 1998a ; Wulff *et al.* 1998),

(2) il possède plusieurs modes d'action (*i.e.* mycoparasitisme, antibiose, promotion de croissance et stimulation des défenses naturelles) (Benhamou *et al.* 1999 et 2001; Le Floch *et al.* 2003a, 2007, 2009; Rey *et al.* 2005 et 2008 ; Vallance *et al.* 2009, 2012) et (3) il produit trois protéines élicitrices nommées : oligandrine, POD1 et POD2 qui ont été identifiées et purifiées (Picard *et al.* 2000b ; Takenaka *et al.* 2003). Cet oomycète a également été décrit comme étant capable de protéger la vigne contre les infections par *Botrytis cinerea*, l'agent de la pourriture grise (Mohamed *et al.* 2007) par stimulation des mécanismes de défense.

Comme décrit dans le chapitre précédent, l'esca est une maladie à l'étiologie complexe impliquant plusieurs champignons pathogènes (Bruez *et al.* 2013). Ces agents fongiques sont capables de dégrader le bois et l'un d'entre eux, *P. chlamydospora*, est décrit comme ayant un rôle central dans cette maladie. Il agit en effet comme un champignon pionnier dans le processus séquentiel de dégradation des tissus ligneux. Dans la littérature, du fait de la complexité de cette maladie, la majorité des études se focalise sur une espèce pathogène. Dans notre cas, nous étudierons la protection contre *P. chlamydospora*.

### Démarche scientifique

Afin de mettre en place une protection efficace contre ce pathogène, trois actions ont été réalisées, chacune correspondant à un chapitre qui sera développé dans le manuscrit :

1. L'isolement et la sélection de souches de *P. oligandrum* à partir de racines ceps cultivés dans différents vignobles.
2. L'étude de la relation spécifique établie entre *P. oligandrum* et *V. vinifera* lorsqu'il colonise son système racinaire.
3. L'étude de la protection contre un agent pathogène pionnier impliqué dans l'esca, *P. chlamydospora*, par induction des mécanismes de défense de la vigne.

1. Souches de *P. oligandrum* isolées des ceps : il est fréquemment rapporté que les échecs en lutte biologique sont dus à la non persistance des micro-organismes sur la plante qu'ils sont censés protéger. L'utilisation de souches provenant de végétaux et environnements très éloignés est souvent associée à une colonisation erratique de la plante. Afin d'éviter ce problème, notre première action a consisté à rechercher et à caractériser des souches de *P. oligandrum* à partir d'échantillons de racines de vigne prélevés dans 12 vignobles de la région viticole de Bordeaux (photographie 1).



Photographie 1 Exemple de localisation de deux parcelles (codées 9 et 12) de la sous-région des Graves.

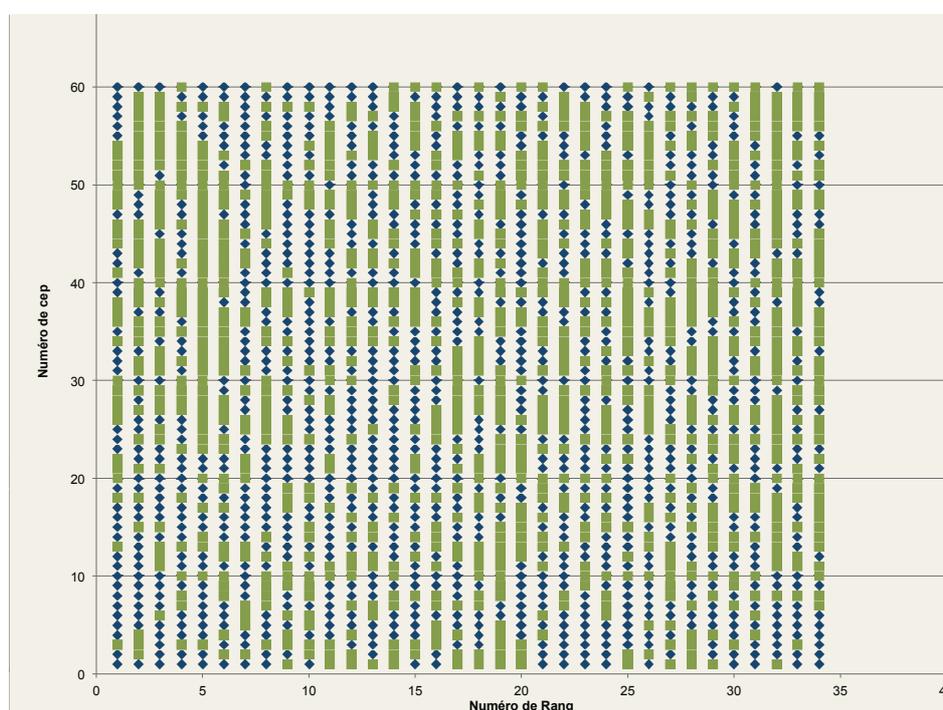


Figure 1 Visualisation de l'état sanitaire des ceps de la parcelle 9. Les plants ayant exprimé au moins une fois des symptômes foliaires d'esca au cours des 4 dernières années, ceux qui sont morts ou qui présentent un cordon manquant sont représentés en bleu, les ceps esca-asymptomatiques sont en verts (Notations selon Bruez *et al.* 2013). Cette cartographie a permis de sélectionner aléatoirement 10 ceps de vigne pour l'échantillonnage réalisé en 2010 et 2011.

Les sols de ces parcelles étaient très variés : 4 de la région du Libournais avaient une composition essentiellement argilo-calcaire, 4 situés dans le Médoc contenaient des mélanges sable-graveleux et 4 dans les Graves étaient graveleux. Les communautés fongiques et bactériennes de la rhizosphère de vigne ont été étudiées par empreinte moléculaire (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP) afin de déterminer dans quel contexte microbien les souches de *P. oligandrum* étaient capables de croître. La SSCP est une technique maîtrisée au laboratoire qui permet l'étude globale des communautés microbiennes à partir de leur ADN. Une collection de souches de *P. oligandrum* a été constituée, leur identification moléculaire ayant été réalisée par séquençage de la région ITS. Les souches de *P. oligandrum* ont également été caractérisées par séquençage de gènes d'éliciteurs spécifiques de l'oomycète, ainsi qu'au niveau biochimique pour la production de la protéine élicitrice extracellulaire, l'oligandrine. Enfin, l'aptitude des souches de *P. oligandrum* à induire une résistance chez la vigne a été étudiée. Un test in vitro de criblage sur disque foliaire a été utilisé car il permet l'évaluation d'un grand nombre de souches en peu de temps. Dans ce modèle de criblage où l'induction de résistance est étudiée, l'agent phytopathogène utilisé est *Erysiphe necator* (oïdum de la vigne). Cette action est présentée dans le chapitre 3.

2. Interaction Vigne / *P. oligandrum* : Cette action vise à apporter des connaissances fondamentales sur l'interaction atypique mise en place entre *P. oligandrum* et *V. vinifera*. Ce type de relation a été initialement décrit chez la tomate, mais il est relativement peu connu chez la vigne. Ces connaissances sont importantes pour comprendre les réponses de la plante à ce type de micro-organisme, en particulier pour déterminer dans quelle mesure l'oomycète provoque des modifications au niveau de la physiologie de la plante.

Cette relation a été étudiée par analyse transcriptomique (technologie microarray) et elle est présentée au chapitre 4. Cette technologie a été choisie car elle a été utilisée avec succès lors de l'étude des relations plantes / micro-organismes par de nombreux auteurs (Both *et al.* 2005 ; Colebrook *et al.* 2012 ; Huang *et al.* 2011 ; Libault *et al.* 2010 ; Maleck *et al.* 2000 ; Verhagen *et al.* 2004). Elle apporte une vision globale des modifications transcriptionnelles induites chez la plante et permet l'identification des gènes spécifiques lors d'une interaction. Cette technologie nécessite des approches bioinformatiques pour le traitement des données obtenues et les analyses statistiques.

3. Interaction Vigne / *P. oligandrum* / *P. chlamydozoa* : Elle concerne l'étude de l'interaction tripartite entre un agent de biocontrôle, la plante et un agent pathogène (chapitre 5). Un essai sous serre a été réalisé afin d'évaluer la capacité de *P. oligandrum* à protéger

de jeunes plants de vigne contre l'infection par *P. chlamydospora*. Une étude par Reverse-Transcriptase PCR quantitative (RT-PCRq) et par transcriptomique (microarray vigne) a été réalisée afin de caractériser les réponses de la vigne selon les conditions de colonisation par les micro-organismes utilisés (*P. oligandrum* et/ou *P. chlamydospora*). L'intérêt de la RT-PCRq réside dans la rapidité d'obtention des résultats et dans son utilisation en routine pour l'analyse ciblée de plusieurs gènes. Dans cette étude, la RT-PCRq a permis d'étudier l'expression de gènes de défenses de la vigne, comme ceux codant pour les protéines PR ou les phytoalexines. La technologie microarray est complémentaire de la RT-PCRq car elle donne une vision plus globale des modifications transcriptionnelles, elle permet l'analyse d'environ 30 000 gènes chez la vigne. Par contre, elle est moins sensible que la RT-PCRq au niveau de la quantification de l'expression génique.

### **Discussion générale et perspectives**

Cette partie permettra de synthétiser les résultats obtenus dans les différentes actions et de répondre à plusieurs questions: *P. oligandrum* colonise-t-il fréquemment les racines de ceps de vigne placés dans différents contextes culturels (e.g. sols différents) ? La présence de *P. oligandrum* sur les racines de *V. vinifera* modifie-t-elle significativement la physiologie de la plante ? La résistance induite chez la vigne par *P. oligandrum* est-elle associée au phénomène de potentialisation des systèmes de défense ? Est-il possible d'identifier des gènes spécifiquement exprimés lorsque la plante est protégée contre un agent pathogène impliqué dans l'esca ?

Les réponses à ces questions permettront d'avancer (1) dans la compréhension des mécanismes mis en jeu lors du biocontrôle par utilisation de micro-organismes et (2) dans l'amélioration de cette méthode de protection, notamment en terme d'efficacité.



# 3

## Chapitre

# *Pythium oligandrum*, agent colonisateur de la rhizosphère de vigne : écologie, diversité génétique et protection des plantes

## Introduction

Les agents de biocontrôle microbiens représentent une voie alternative à l'utilisation des pesticides chimiques. Au laboratoire les candidats potentiels sont nombreux mais peu d'entre eux sont homologués et employés par les agriculteurs. De plus, l'efficacité constatée au champ est souvent très variable (Alabouvette *et al.* 2006). Plusieurs auteurs soulignent qu'une attention particulière doit être apportée lors de la sélection des souches à leur capacité à s'intégrer et persister dans l'agrosystème à protéger (Alabouvette *et al.* 2006 ; Edel-Hermann *et al.* 2009 ; Gerbore *et al.* 2013 ; Vallance *et al.* 2009). En effet, ces souches doivent être compatibles avec les pratiques culturales du végétal, les pesticides chimiques employés pouvant par exemple inhiber ou fortement entraver leur développement.

Pour ces raisons il a été décidé de rechercher et d'isoler des souches de l'agent de biocontrôle *P. oligandrum* naturellement présentes au vignoble. La vigne a été choisie car elle occupe une place centrale dans l'agriculture, l'économie et la culture en Aquitaine, région où l'UMR Santé et Agroécologie du Vignoble est implantée. Cette étude a bénéficié d'un réseau de parcelles suivi par l'observatoire national des maladies du bois depuis 2003. Des ceps « sains » n'ayant jamais exprimé des symptômes foliaires d'esca au cours des 4 dernières années ont ainsi pu être sélectionnés, ceux-ci pouvant être des hôtes « réservoirs » d'agents antagonistes adaptés à la vigne du Bordelais, et peut-être des régions viticoles françaises. Les souches isolées ont été caractérisées à l'aide d'outils moléculaires, sur la base de la présence de plusieurs gènes dont ceux codant pour des protéines stimulatrices des défenses des plantes. Le contexte microbien dans lequel *P. oligandrum* se développe, c'est-à-dire la microflore de la rhizosphère, a également été étudié grâce à une méthode

d'empreinte moléculaire, la SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism). Cette technique est présentée à la suite de ce paragraphe. Puis un bio-essai *in vitro* a été réalisé afin de vérifier l'aptitude des souches à exercer une protection de la vigne.

#### *Description de la technique de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)*

La SSCP est une méthode d'empreinte moléculaire qui permet d'étudier globalement les communautés microbiennes à partir de leur ADN. Développées dans les années 1990, les méthodes d'empreintes moléculaires, *i.e.* la T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), la RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) ou encore la SSCP, consistent à analyser certaines portions d'ADN directement extraits d'échantillons environnementaux.

Ces approches doivent leur développement aux progrès réalisés dans les techniques d'extraction et d'amplification de l'ADN (Martin-Laurent *et al.* 2001). Deux grandes catégories de gènes sont généralement étudiées, ceux dits fonctionnels et les ARN ribosomiques qui sont des cibles de choix pour la caractérisation *in situ* des communautés microbiennes du sol (Anderson et Cairney 2004 ; Baker *et al.* 2003 ; Mitchell et Zuccaro 2006). La plupart des applications sont basées sur les gènes codant pour la petite sous unité de l'ARN ribosomal (Kowalchuk *et al.* 2006) mais d'autres marqueurs génétiques tels que la grande sous unité ribosomale (23S chez les procaryotes, 28S chez les eucaryotes), les régions ITS ou certains gènes fonctionnels comme les facteurs d'élongation ont également été développés.

Dans notre étude, la technique SSCP a été utilisée afin d'analyser et de comparer les empreintes moléculaires des différentes communautés microbiennes colonisant la rhizosphère de la vigne. Cette technique (Figure 1) est basée sur la migration différentielle en conditions non dénaturantes d'ADN simple brin ayant adopté une conformation tridimensionnelle particulière en fonction de la séquence nucléotidique et de l'environnement physico-chimique (température et force ionique). Les différentes conformations génèrent des comportements migratoires et des mobilités différentes, rendant possible la séparation de mélanges complexes d'ADN.

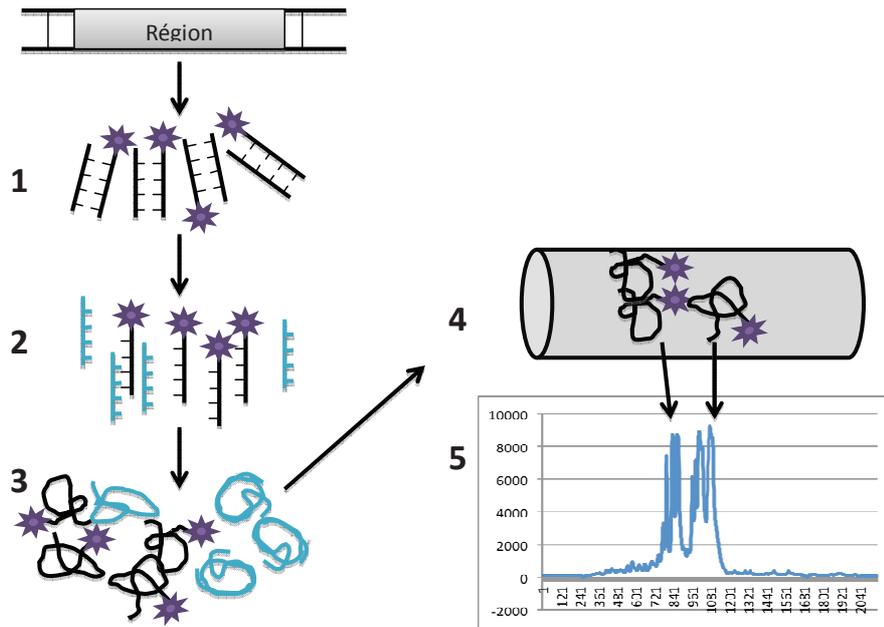


Figure 1. Principe de la SSCP

(1) Amplicons de la PCR ayant été générés en utilisant un couple d'amorces dont une était marquée par un fluorophore représenté par une étoile sur la figure. (2) Dénaturation des amplicons 5 min à 95°C. (3) Chaque brin dénaturé est refroidi à 0°C, il prend une conformation tridimensionnelle spécifique maintenue par la présence de formamide. (4) Les brins passent dans le séquenceur en électrophorèse capillaire et migrent à des vitesses variables selon leur taille et leur poids. (5) La fluorescence est détectée au cours du temps, un chromatogramme est obtenu à partir des résultats générés par le séquenceur pour chaque échantillon. Les échantillons sont ensuite alignés ensemble à l'aide d'un étalon interne préalablement inclus dans chaque échantillon.

Comme les autres techniques d'empreintes moléculaires, la SSCP présente certains inconvénients : certains ADN simple brin peuvent adopter plusieurs conformations, il en résulte que plusieurs pics/bandes peuvent représenter un même ribotype ; à l'inverse, un pic/bande 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 microbiennes rhizosphériques soumises à des perturbations physico-chimiques (Chave *et al.* 2008) ou à l'introduction d'un oomycète (Vallance *et al.* 2009), la dynamique des populations bactériennes dans un bioréacteur anaérobie (Delbès *et al.* 2000 ; Zumstein *et al.* 2000) ou dans des biofiltres (Renault *et al.* 2012).

Dans la suite du texte, ce chapitre est présenté sous la forme d'une publication intitulée : « Population structure of the oomycete, *Pythium oligandrum*, is not shaped by abiotic and biotic factors in the vineyards » Cette publication est soumise à la revue *Applied and Environmental Microbiology* (AEM).



**Population structure of the oomycete, *Pythium oligandrum*, is not shaped by abiotic and biotic factors in the vineyards**

Jonathan Gerbore<sup>1,3,4</sup>, Jessica Vallance<sup>2,1</sup>, Amira Yacoub<sup>1,4</sup>, François Delmotte<sup>1,2</sup>, Damien Grizard<sup>3</sup>, Catherine Regnault-Roger<sup>4</sup>, and Patrice Rey<sup>2,1</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE), ISVV, 33140 Villenave d'Ornon, France.

<sup>2</sup> Bordeaux Sciences Agro, Université de Bordeaux, ISVV, UMR1065 SAVE, 33140 Villenave d'Ornon, France.

<sup>3</sup> BIOVITIS, 15400 Saint Etienne de Chomeil, France.

<sup>4</sup> UMR CNRS 5254/IPREM-EEM, IBEAS, Université de Pau et des Pays de l'Adour, 64013 Pau, France.

Correspondence: P. Rey, INRA, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, ISVV, 33140 Villenave d'Ornon, France.

E-mail: [prey@bordeaux.inra.fr](mailto:prey@bordeaux.inra.fr)

## Abstract

Knowledge about the effect of various abiotic and biotic factors in shaping population structure of plant-potentially beneficial microorganisms is important for plant protection management. The present study focused on one oomycete, *Pythium oligandrum*, well-known for its plant protection abilities. From 3 sampling Bordeaux sub-regions with various types of soil (4 vineyards per sub-region), the genetic structures and the dynamics of fungal and bacterial communities were studied using single-strand conformation polymorphism (SSCP). The structure of the fungal communities colonizing the rhizosphere of vines planted in sandy-stony soils was markedly different from that of the silty and sandy soils; such differences were not observed for bacteria. In our 2-year experiment, within this biotic-abiotic context, the roots of all the vines samples were colonized by echinulated-oospore *Pythium* species with *Pythium oligandrum* predominating. Cytochrome oxidase I and tubulin gene sequencings showed that *P. oligandrum* strains clustered into three groups. As regards elicitor-like genes whose proteins are key molecules for inducing systemic resistance in plants, six different groups were obtained. However, none of these groups was assigned to a particular sub-region of Bordeaux vineyards, suggesting that these factors do not shape the genetic structure of *P. oligandrum* population. Determining which factors should favor the management of beneficial microorganisms is discussed with regards to cropping practices, such as different types of rootstock and weeding management that can influence root colonization by *P. oligandrum*.

## INTRODUCTION

The vineyard region of Bordeaux, thanks to its really prestigious wines, enjoys a worldwide reputation. It also has a long history of plant diseases that have left their mark. At the end of the 19<sup>th</sup> century, for instance, various epidemics, such as powdery and downy mildews, as well as phylloxera, broke out in the Bordeaux vineyards, causing severe losses to grapevine harvests or even to lifespan (1). The time of new outbreaks is, however, not over as exemplified by the spread, within the span of a mere two decades, of the major phenomenon of vine decay due to grapevine trunk diseases (GTDs) (2). Throughout the world, vineyards are being attacked by GTDs and, in France, all the wine-producing regions are affected. GTDs are on the increase and, currently, approximately 14% of Bordeaux vineyards are unproductive (3), essentially because of these diseases, *i.e.* esca, eutypa and *Botryosphaeria* diebacks. So, viticulture is now confronted with vast upheavals, brought about by the need to control various diseases whilst dealing with strong consumer demands for an environmentally friendly viticulture. The objective of the viticulture sector is thus to dramatically reduce the use of chemical pesticides to control pathogens, *e.g.* the two mildews, but at the present time, no pesticides are available to control GTDs. So, in order to develop methods compatible with viticulture sustainable issues, environmentally friendly methods have to be designed.

Managing microbiota that colonize the rhizosphere of grapevines to promote suppressive activity could be useful in providing new tools to achieve effective plant protection. In the vineyards, potentially beneficial microorganisms naturally colonize the roots of grapevines (4), but their persistency over a long period is relatively unknown. Cultural practices such as weeding management (5) and soil morphology (6) have an impact on the soil microbiota of vineyards. They could thus shape the population structures of beneficial microorganisms. In

the present study, we have focused our attention on a common oomycete inhabitant of soils worldwide, *Pythium oligandrum*. It has been described as one of the most numerous species in several agricultural soils (7,8,9,10,11,12,13,14). Interestingly, Martin and Hancock (15) have found high propagule densities of *P. oligandrum* in soil that is suppressive to the pathogen, *Pythium ultimum*, in cotton fields in California. However, although *P. oligandrum* is rhizospheric competent for many plants (16,17,18,19), its ability to colonize the roots of grapevines is relatively unknown, although Mohamed *et al.* (20) suggested it is common in viticulture soils. The same authors showed that, after treatment of vine roots with the oomycete, plant protection against the grey mold agent, *Botrytis cinerea*, was obtained. Numerous plant diseases have been controlled by *P. oligandrum*, with a reduction in plant pathogenic attacks varying from 15-100 % (21). As recently reviewed by Benhamou *et al.* (22) and Gerbore *et al.* (21), the plant protection provided by *P. oligandrum* is the result of a complex process that includes (i) direct and/or (ii) indirect effects on the pathogens. As regards the direct effect, features of mycoparasitism and/or antibiosis and/or nutrient elements competition are currently observed when *P. oligandrum* interacts with many fungi and oomycetes (23,24,25). Vallance *et al.* (26) have demonstrated that, after introduction of *P. oligandrum* in the root system of hydroponic tomatoes, transient perturbations in the rhizospheric indigenous bacterial communities were observed, suggesting that it may also have a potential anti-bacterial effect. However, Hase *et al.* (27) reported that the ability of *P. oligandrum* to control tomato wilt caused by the bacterial pathogen, *Ralstonia solanacearum*, resulted from stimulation of the plant defenses, rather than from a direct antagonistic process. This particular point is worth being mentioned because, for many scientists, the main mode of action of *P. oligandrum* is the resistance it induces in numerous plants.

It should be noted that this induced resistance begins after the establishment of a really atypical relationship between *P. oligandrum* and the plant: the hyphae penetrate quickly and deeply into the tomato root tissues without causing damage, but they rapidly degenerate and cannot stay alive *in planta* (28,29,30). After this unusual root colonization process, local and systemic induced-resistances occur in plants and, as a result, protection is provided against a broad range of pathogens (17,19, 20,24,31,32,33,34).

Consequently, *P. oligandrum*, particularly the strains that produce the three elicitor-like proteins, *i.e.* oligandrin, POD1 and POD2, responsible for this induced resistance, has considerable potential in protecting vines from pathogenic diseases. Previous reports have already shown that *P. oligandrum* strains are useful on a range of crop plants in small-scale field, soil and soilless greenhouse trials, but enhanced protection should certainly come from the selection and use of elicitor-like producing strains. Because the three elicitor-like proteins had not been isolated and described at the time, this point was not verified in many of the previous publications on *P. oligandrum*. Another issue is that the protection endowed with biocontrol agents (BCA) in the field experiments often fails because of inconsistency (35). This inconsistency is generally associated with numerous factors, including biotic and abiotic factors, which may have an influence on BCA activity. For instance, Edel-Hermann *et al.* (36) demonstrated that the biocontrol agent, *Fusarium oxysporum* strain 47, was more susceptible to the biotic factor than to the physico-chemical properties of the soils. In addition, the ecological fitness of BCA is also worth being considered (37,38,39). So, selection of BCAs that can be active under various environmental factor changes, and also determination of their ecological fitness, are certainly prerequisites before being used in the field.

Accordingly, in the present experiment, our overall objective is to determine whether abiotic and biotic factors applied in the vineyard shape the population structures of the antagonistic oomycete, *P. oligandrum*. We will therefore (i) determine whether *P. oligandrum* is able to naturally colonize the roots of grapevines planted in different types of soil from the Bordeaux vineyards; (ii) study the rhizospheric microbiological environment (bacteria and fungi) in which *P. oligandrum* can grow, (iii) assess the genetic variability of the strains by sequencing various phylogenetic and elicitor genes; (iv) evaluate the strains abilities to produce oligandrin and to induce disease resistance, this experiment have been carried out by using a bioassay against powdery mildew.

## MATERIALS AND METHODS

**Root sampling in vineyards.** Samples of roots were taken from grapevines grown in vineyards from the Bordeaux region (France). Twelve plots were selected: four in the Medoc sub-region of Bordeaux, four in the Libournais sub-region and four others in the Graves sub-region (Fig. 1). Each sub-region and plot is characterized by a typical soil composition given in Table 1, the percentages of silt, clay, sand and stone were measured by the LCA Bordeaux Laboratory (Blanquefort, France).

The vineyards were planted with the same cultivar, Cabernet-Sauvignon (*Vitis vinifera* L, 20 to 24 years old), with three rootstocks (coded: n° 3309, n° 101-14 et SO4) and were trained using the Guyot double method. In each plot, a survey of plants was monitored to assess the grapevines with leaf symptoms of grapevine trunk diseases. Depending on the vineyards, weeding management was made either by applying herbicides (2 treatments per year on average) or by mechanical plowing between the rows of grapevines. Note that, 10 to 12 fungicide treatments on average were applied each year in these vineyards to control downy and powdery mildews.

Roots (minimum 5 g) were sampled from 10 plants in the summers of 2010 and 2011 (July and August) at a depth of 20 cm, and plants were randomly selected from healthy grapevines. The rhizosphere of the same grapevines was sampled in 2010 and 2011. The root samples were subsequently used for microbial and molecular analyses.

**Assessment of roots colonization by *Pythium* spp. with echinulated-oospores and purification of strains.** For each of the 240 plants sampled, *Pythium* spp. with echinulated-oospores rhizosphere colonization was assessed by setting 30 root fragments (5-mm length) on a

selective medium for *Pythium*, made up of Corn Meal Agar supplemented with antibiotics, coded CMA-PARP (40). Five and 10 days after incubation of Petri dishes in the dark at 25°C, oomycete structures were observed with the optical microscope. Using the Plaats-Niterink (14) morphological descriptions of *Pythium* species, echinulated-oospores could be identified. Hypha emerging from each root fragments were taken and cultured several times, until pure cultures were obtained for each isolate.

For each sample, the number of root fragments colonized by hyphae producing echinulated-oospores was determined. The differences between vineyards were evaluated by ANOVA, after normalization (transformation in  $\log(x+1)$  of the data) and validation of variance homogeneity (with Levene test) with R software version 2.15.2. The Tukey test was used to compare the means.

**DNA extractions of *Pythium* spp. strains.** For each purified *Pythium* strain, genomic DNA was extracted from young mycelium, scraped from the surface of a Malt Agar plate by using a sterile tip. Samples were freeze-dried overnight (Alpha 1-4 LO plus, Bioblock Scientific) and ground with a Tissue Lyser II (Retsch, Qiagen) for 60 s at a frequency of 30 s<sup>-1</sup>. Four hundred µl of CTAB (1x) was added to each sample. After incubation at 65°C for one hour, 400 µl of chloroform-isoamyl-alcohol (24:1, v/v) was added and the samples were centrifuged for 30 min at 3700 rpm. The aqueous phase was transferred into another tube and 200 µl of cold isopropanol were added. Samples were then kept at -20°C overnight for DNA precipitation. After 20 min centrifugation at 3700 rpm, the supernatant was discarded and 500 µl of ethanol 70% was added to wash the DNA. Once the ethanol was discarded, the pellets were air-dried and suspended in 70 µl of sterile distilled water. DNA concentration was estimated using nano-drop (ND-1000, ThermoScientific, Labtech).

**Molecular characterization of *Pythium* strains by sequencing.** The primers used to sequence *Pythium* with echinulated-oospores strains are summarized in Table 2. PCR identification of *P. oligandrum* isolates was performed by sequencing the rDNA repeat unit, *i.e.* 3' end of the 18s rRNA gene, ITS-1, 5.8s rRNA gene, ITS-2, and approximately 580 bp of the 5' end of the 28S rRNA (41). *P. oligandrum* elicitor detections were carried out by amplification of oligandrin gene (oligandrinF and oligandrinR primers) and POD1 gene (T1C and T1f primers) as described by Masunaka *et al.* (42). Strain genetic polymorphism was evaluated using Tubulin (primers were designed with Primerclade software, Gadberry *et al.*, (43) and cytochrome region genes (44).

Polymerase chain reaction was carried out in a thermocycler (Mastercycler gradient Eppendorf AG 22331, Eppendorf, France) with 10 ng of template DNA. Six µl of the PCR product was used for electrophoresis on 2 % agarose gel and then visualized using ethidium bromide staining to control PCR efficiency. The PCR products were sequenced, on two strands, by GATC Biotech AG (Konstanz, Germany) and consensus sequences were determined after alignment, using CodonCode Aligner software (version 4.2.1). ITS sequences were assigned to species, based on 99% sequence similarity threshold, after blasting with GenBank database. Phylogenetic trees were constructed using the PhyML method on Seaview software (version 4.4.0), based on multiple alignments (45).

**Oligandrin production from culture filtrates of *P. oligandrum* strains.** Liquid media of *P. oligandrum* strains were obtained from mycelium culture in a defined medium stimulating the production of elicitor (46). The flasks were incubated in the dark for 10 days at 24°C. Culture filtrates of *P. oligandrum* were recovered after mycelium removal on a GF/C filter (Whatman, Clifton, NJ) under vacuum, in a ten-fold concentration. Oligandrin production was quantitatively assessed by HPLC as described by Picard *et al.* (24) with slight modifications. Briefly, HPLC

(HP 1100 Series HPLC System, Agilent Technologies, USA) was performed on a C8 column (Zobrax Eclipse XDB-C8, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 \*150 mm, Agilent Technologies, USA), and 10  $\mu\text{l}$  of culture filtrate was loaded. Elution was carried out using the following solvents: A [20%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 10 mM  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , and 20 mM  $\text{HCOONa}$ ] and B (40%  $\text{CH}_3\text{CN}$  and 100 mM  $\text{HCOONa}$ ) using a linear gradient: 100% A 3 100% B (10 min), and 100% B hold for 2 min. The flow rate was 1 ml/min.

Elution was monitored with an Agilent G1315A Diode Array Detector (200–400 nm, resolution: 4 nm). Integration at 280 nm, spectra, peak purity, and all calculations were obtained using HP Chemstation software (version G1656B, Agilent Technologies, USA). A purified extract of oligandrin provided by Dr Michel Ponchet (UMR 1301 Interactions Biotiques et Santé Végétale, INRA Sophia Antipolis, France) was used as a standard.

**DNA extraction of root samples.** The root samples were ground in liquid nitrogen with a one-ball mill of Danguomau type. DNA was extracted from 70 mg of root tissue with the Indvisorb Spin Plant mini Kit (Eurobio, France) in accordance with the manufacturer's instructions. DNA extracts were then quantified with a nanodrop (ND-1000, ThermoScientific, Labtech) and homogenized at a concentration of 10  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ .

**Analysis by CE-SSCP of the fungal and bacterial communities of the rhizosphere.** Pairs of universal primers recognizing mitochondrial large-subunit rDNA (ML1/ML2) (47) gene and the variable regions V5-V6 of the 16S rRNA (799F/1115R) (48) were used for CE-SSCP analysis of the fungal and bacterial communities, respectively. PCR was performed on DNA extracts from the 240 root samples collected. DNA was amplified by PCR in a PTC-100 thermocycler (MJ Research, Inc.) in a reaction mixture (25  $\mu\text{l}$  final volume) consisting of 1  $\mu\text{l}$  of DNA template, 0.2 mM concentration of each deoxynucleoside triphosphate, 2  $\text{ng}/\mu\text{l}$  of

each primer, 2.5 µl of 10x Pfu Turbo buffer, and 0.05 U of Pfu Turbo DNA polymerase (Stratagene, The Netherlands). The cycling conditions were as follows: enzyme activation at 95°C for 2 min, 35 cycles of denaturation at 95°C for 30s, hybridization for 30s at 58°C for fungi and 61°C for bacterial primers, extension at 72°C for 30s and final extension at 72°C for 10 min. The PCR products were visualized by ethidium bromide staining on agarose gel electrophoresis prior to CE-SSCP analysis. The lengths of the fragments yielded by amplification of fungi DNAs were approximately 250 bp for fungi and 350 bp for bacteria. CE-SSCP analyses were performed on an ABI Prism 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) using four 36-cm-long capillary. One microliter of a PCR product was mixed with 18.8µl Hi-Di formamide (Applied Biosystems) and 0.2 µl of the internal standard DNA molecular weight marker Genescan 400 HD ROX (Applied Biosystems). The sample mixture was denatured at 95°C for 5 min and immediately cooled on ice for 10 min before being loaded onto the instrument. The non-denaturing polymer consisted of 5% POP conformational analysis polymer (Applied Biosystems), 10% glycerol, EDTA buffer (10x), and water (Applied Biosystems). The migration time was set for 50 min, the voltage at 12 kV and the temperature at 32°C. CE-SSCP is based on the electrophoretic mobility of single-stranded DNA fragments. This mobility is different according to their three-dimensional conformation. The samples were then allowed to co-migrate with the fluorescent size standard (GeneScan 400 ROX) to enable comparison of migration profiles between samples. Patterns were aligned with the StatFingerprints program (49) and studied by principal component analysis (PCA) with R (version 2.15.2).

**Structure and diversity analysis of microbial communities.** The characterization of the rhizospheric microbial (fungi and bacteria) communities' structure and diversity was performed with profiles obtained by the CE-SSCP method, as previously described by Kimsé *et al.* (50) and Michelland *et al.* (49,51). All readable molecular fingerprint profiles were aligned with the internal ROX ladder and normalized, in order to produce relative abundance data with the R package Statfingerprints v1.3 software (49,50). This yielded a matrix in which root samples were indicated in rows, and fluorescence values (1315 scans) in columns. A fluorescence profile may be seen as a quantitative descriptor of the microbial assemblage of a sample. Bigger differences in fluorescence scans between profiles indicate a greater dissimilarity in composition between samples (49,50).

Rhizospheric microbial (fungi and bacteria) community diversity was evaluated using the Simpson diversity index. This diversity index was estimated by summarizing a complex community, represented in a molecular fingerprint profile, by a single value. This takes into account the number of species (number of peaks) and their relative abundance (area under each peak). The Simpson diversity index ( $D'$ ) was calculated with the R package Statfingerprints v1.3, as previously mentioned by (52) and (51) respectively:

$$D' = - \log \sum p_i^2 = \sum \left[ \frac{n_i(n_i-1)}{N(N-1)} \right] / \sum p_i^2 = \sum \left[ \frac{n_i(n_i-1)}{N(N-1)} \right]$$

where  $n_i$  is the number of individuals in the  $i$  species and  $N$  the total number of individuals.  $P_i$  is the relative abundance of species  $i$ . According to this method of calculation, Simpson index values will be higher than 1 and will allow relative comparisons between the various data.

Fingerprint molecular profiles were studied using principal component analysis (PCA) in relation to environmental factors with R software (version 2.15.2, including FactoMineR packages) and the Simpson index was subject to analysis of variance (ANOVA) and Tukey test comparisons.

**Leaf grapevine protection bioassay.** *In vitro* inhibition of powdery mildew (*Erysiphe necator*) was assessed in a leaf grapevine bioassay test. After leaf disinfection (10 min in 3% hypochlorite, rinsed in sterile distilled water), leaf discs (24 mm diameter) were cut (7 replicates per treatment) and dipped for 4 hours in (i) *P. oligandrum* culture filtrates (diluted at 1/50), (ii) oligandrin (1.8 µg.ml) or (iii) in sterile distilled water (DW) as control.

Discs were then removed and set, top side up, in Petri dishes containing agar (20 g.l<sup>-1</sup>) and benzimidazole (30 mg.l<sup>-1</sup>). Pathogen inoculation, *E. necator* strain GF 5.5.3 (UMR SAVE collection), was carried out using an air pump to blow spores from 12-day-old sporulating leaves onto the upper surface of the discs. The density of deposited conidia was 850 and 750 spores/cm<sup>2</sup> respectively for the first and second experiment. Leaves were incubated in growth chamber at 22°C. Disease was assessed at 12 days after inoculation. For each of the 7 replicates, the disc area covered by the fungus mycelium was assessed visually and the number of spores counted, using a particle counter (Coulter Counter Multisizer 3; Beckman Coulter, Paris-Nord, France). The experiment was repeated twice and statistical analysis of variance (ANOVA) and Tukey comparisons were made using R software.

## RESULTS

**Characterization of soil vineyards.** Vineyard soils were characterized by their physical parameters as shown in Table 1, with all of these soils containing various quantities of clay, sand, silt and stone. For instance, the vineyards of the Médoc sub-region have the greatest quantities of sand (62-83%); but stone (14- 33%), silt (8-16%) and clay (9 to 20%) are also detected. Of the 12 vineyards, those of the Libournais sub-region contained the highest quantities of silt (49-55%), but clay (14-35%) and sand (from 14 to 31%) were also relatively frequent. In the soil of the four vineyards from the Graves sub-region, sand was predominant (79 to 84%) along with stone (from 38 to 58%), and the lowest values were for clay (6-8%).

Using these data, together with weeding management and rootstock as supplementary factors data, Principal Component Analysis (PCA) was generated (Fig. 2). Eigenvalues of PCA indicated that the first two principal components, Dim1 and Dim2, covered 93.5% of the total data variance and gave a consistent description of the global database. The Graves (mainly sandy-stony texture) soils were clearly separated from Médoc (mainly sandy texture) and Libournais (mainly silty texture) soils by Dim1 (respectively negative versus positive coordinates).

**Structure of the fungal and bacterial communities that colonize the rhizosphere of grapevines.** As regards fungal communities, PCA eigenvalues indicated that the first two principal components, Dim1 and Dim2, explained 53.1% of the total data variance (Fig. 3). The SSCP profiles of fungal communities (based on mitochondrial large-subunit rDNA gene) from roots of grapevines grown in Médoc and Libournais sub-regions were clearly separated from those of the Graves vineyards by Dim1 (negative versus positive coordinates,

respectively). Fungal communities from grapevines of Médoc tended to be separated from those of Libournais by Dim2 (positive versus negative coordinates, respectively). It should be noted that the same results were obtained for the 2 years of experiment.

For the bacterial communities, PCA eigenvalues indicated that the first two principal components, Dim1 and Dim2, explained 84% of the total data variance (Supplementary Fig.1). The SSCP profiles of bacterial communities (based on 16s rRNA gene) from grapevine roots grown in the 3 sub-regions, Graves, Médoc and Libournais, cannot be separated by Dim1 or Dim2. The same results were obtained for the 2 years of experiment.

For the 3 sub-regions, based on weeding management or rootstocks, the fungal and bacterial communities colonizing the roots of grapevines were not separated by PCA analysis (data not shown).

**Diversity of fungal and bacterial communities colonizing the rhizosphere of grapevines.** The Simpson index, which takes into account the relative abundance of each population, was calculated to assess the diversity of rhizospheric fungal and bacterial communities. This index is heavily weighted toward the most abundant species so that, when the index is high, diversity is low. In 2010, the Simpson index of fungal communities from Graves vineyards was statistically higher (6.38) than in the Libournais (5.00) and Médoc (4.73) vineyards (Table 3). In 2011, all these values increased but a similar trend was observed.

For the bacterial communities, the Simpson indexes were relatively similar for the 3 sub-regions, varying from 7.03-7.98 in 2010 and from 7.6-7.93 in 2011. For the 2 years, these values were not significantly different.

**Assessment of echinulated-oospores *Pythium* spp. root colonization in the various vineyards.** Root colonization by *Pythium* spp. with echinulated-oospores was assessed using plate counting (Fig. 4). *Pythium* spp. were isolated in 11 out of 12 vineyards in 2010 and, in all the vineyards, in 2011. The highest value was obtained in vineyard n°11, 22.67% in 2010, and the lowest, 0%, in vineyard n°5 in 2010.

For the Graves sub-region, the highest values, *i.e.* over 15% of roots colonized by *Pythium* spp. with echinulated-oospores, were obtained in 2 (vineyards n°9 and 11) of the 4 vineyards, in both 2010 and 2011. A similar trend was observed for the 4 Libournais vineyards, with the highest values (over 8%) being obtained in vineyard n°7 and 8. In the Médoc sub-region, the lowest values (below 5%) were obtained in 2 vineyards (n°1 and 4) out of 4, although these same vineyards showed the highest values (over 15%) in 2011.

Nevertheless, as regards echinulated-oospores *Pythium* spp. root colonization, no statistically significant differences were observed between the two years of sampling.

**Influence of various factors on echinulated-oospores *Pythium* spp. root colonization.** For the two years of experiment, the impact of various factors, *i.e.* region sampling sites, rootstocks, weeding management, on echinulated-oospores *Pythium* spp. root colonization was assessed (Table 4).

Roots from plants growing in soil from the Graves vineyards tended to be more colonized in 2010, but the differences with the results obtained from the Libournais and Medoc vineyards were not significant. Similar results were obtained in 2011.

As regards the rootstocks, *Pythium* spp. with echinulated oospores were significantly more frequently isolated on SO4 rootstock (17.33%) in comparison with n°101-14 (9.5%) and n°3309 (4.33%) rootstocks in 2010. A similar trend was observed in 2011, although the differences were not statistically significant.

In 2011, vineyards with chemical weeding had a level of root colonization by *Pythium* spp. with echinulated-oospores which was significantly lower than vineyards in which mechanical weeding was used. A similar trend was observed in 2010, although the differences were not statistically significant.

**Molecular identification of *Pythium* spp. with echinulated-oospores.** A subset of 44 isolates from the 12 vineyards and 4 *P. oligandrum* strains from CBS were sequenced for identification on the ITS1&2 rDNA region. The PCR of the ITS1&2 rDNA region yielded a 1500 bp single product. Forty strains were identified as belonging to *P. oligandrum*, based on 99% blast sequence similarity with the ITS1&2 rDNA region sequences of the strain CBS 382.33 (AY598618.1). Four strains were identified as *P. acanthicum*, based on 99% blast sequence similarity with the ITS1&2 rDNA region sequences of the strain CBS 377.3 (AY598617.1). Only *P. oligandrum* strains have been used for the further analyses or experiments. The *P. oligandrum* sequences obtained showed six haplotypes which differed by only a very few mutations: the two most frequent haplotypes (n=32) varied by only one nucleotidic change, and the four others (n=12) were characterized by a number of mutations, ranging from 1 to 4, compared to the most distant haplotype.

Comparing the strains isolated from vineyards with the CBS strain, two strains were identical to the *P. oligandrum* Dutch strains CBS 530.74, fifteen to the UK (382.34) and to the Australian (118746) strains. Any isolated strains were similar to the Danish (109982) strain. The others strains (23) were distinct from the CBS strains (data not shown)

**Sequencing of genes coding for elicitin-like proteins.** Sequences were obtained from 44 strains for the elicitin-like proteins, oligandrin and Cell Wall Proteins (CWPs). Each strain

had at least one gene coding for oligandrin and one gene coding for a CWP, either POD or POS.

For the oligandrin gene, we found two sequences corresponding to Oli-S1 and Oli-D1 (respectively AB474244 and AB474242), differing by only one silent mutation at position 165 (data not shown).

For the CWP genes, 4 different haplotypes were obtained out of *P. oligandrum* strains: two haplotypes corresponded to the previously described POD-1 and POS-1 genes (respectively, AB474241 and AB217821). The two other haplotypes, POD-1a and POD-1b, closely related to POD-1. POD-1a show two non-synonymous mutations in position 114 and 116. POD-1b shows one non-synonymous and one synonymous mutations respectively in position 233 and 243) (Table 5). POD-1a with Asparagine and Glycine instead of Lysine and Aspartique Acid in position 114 and 116. POD-1b protein with Alanine instead of Aspartique Acid amino acid in position 233. POD-1a and POD-1b are being submitted to Genbank database (submission in progress). POS-1 had the more divergent sequence compared to the three POD1 genes, with eight nucleotidic mutations corresponding to seven amino acids changes.

For each strain, we could establish an “Elicitin Like Protein” (ELP) profile (Table 6, Fig. 5). This led to the identification of six different ELP profiles (Table 6). The most abundant profile observed, ELP-1, was made up of 17 strains possessing POS-1 and Oli-S1 genes. The second profile (ELP-2) was composed of 3 strains with POD-1b, POS-1 and Oli-S1 genes. The third profile (ELP-3) was characterized by 8 strains with 4 genes, POD-1, POS-1, Oli-D1 and Oli-S1. Six strains possessing POS-1, Oli-D1 and Oli-S1 genes represented the ELP-4 profile, and 7 strains with POD-1 and Oli-D1 genes, corresponded to the ELP-5 profile. The last profile, ELP-6, was composed of 3 strains possessing POD-1a and Oli-D1.

Out of the 44 strains analyzed, 27 had ELPs with only 2 genes, *i.e.* groups 1, 5 and 6. Eight strains had ELP with 4 genes.

No clear correlation was observed between vineyard sub-regions (*i.e.* Médoc, Graves and Libournais) and ELP profiles. Nevertheless, ELP-6 was only found in Médoc soils. ELP-1 was dominant and isolated from the three regions. ELP-5 and 2 were observed in Graves and Libournais sub-regions, ELP-3 in Médoc and Graves sub-regions, and ELP-4 only in Médoc and Libournais sub-regions.

**Phylogenetic analysis of *P. oligandrum* strains.** Phylogenetic reconstruction was performed using the tubulin and cytochrome c oxydase subunit 1 sequences (Fig. 5). The phylogenies obtained from the individual gene regions analyzed separately, and from the concatenated dataset, produced congruent topologies. The concatenated tree of 33 *P. oligandrum* strains grouped the strains into three clusters. We found no association between soil type and phylogenetic clusters. Most cluster A strains had the POD-1 and Oli-D1 genes corresponding to a majority of ELP-5. Cluster B was mostly made up of strains with POS-1 and Oli-S1 genes corresponding to ELP-1. Thus, ELP-5 was dominant in cluster A that was also represented by ELP-3,4,6 and 1. Cluster B was mainly composed of ELP-1 (11 strains), ELP-3 (2 strains) and ELP-4 (1 strain). ELP-2 and 4 were equally represented in cluster C, and one strain had an ELP-3 profile.

**Oligandrin production by *P. oligandrum* strains.** Production of the extracellular elicitor-like protein named oligandrin was evaluated by HPLC for 19 *P. oligandrum* strains, with at least one strain for each previously described ELP profiles. Table 7 shows that all the strains produced oligandrin. The mean production was of 68.95 mg/l and the highest quantity was obtained with Lib-14 and 0th-3 with, respectively, 123.81 and 100.07 mg/l. The lowest

production was for Med-1 (24.05 mg/l). Significant differences, depending on the strain, were observed. Lib-14, Oth-3 and Med-13 produced statistically more oligandrin than Lib-5, Med-11, Med-2 and Med-1. Regarding the genetic clade, A, B or C of *P. oligandrum* strains, no significant differences were observed (data not shown). Nevertheless, elicitin production differed according to ELP profiles (Table 8). The highest quantity was produced by a strain with ELP-2 profile (123.8 mg/ml), and the lowest quantity measured for ELP-6 strains (34.6 mg/ml).

**Control of powdery mildew, *Erysiphe necator*, on grapevine leaves.** Grapevine leaves, subject to either *P. oligandrum* culture filtrate or oligandrin, reduced *E. necator* development compared to control treatment (DW) (Table 9). The pathogen leaf coverage and sporulation was significantly reduced respectively, on average, by 48% and 44%, compared to control (distilled water). ELP-3 and ELP-2 strains were significantly more effective in controlling pathogen leaf coverage compared to ELP-4. However, no significant differences in efficacy were observed between culture filtrate from strains and oligandrin treatments.

## DISCUSSION

The major aim of this study was to assess whether various abiotic and biotic factors shaped the population structure of *P. oligandrum*, an oomycete that displays biocontrol activities on many plants. Our results show that *P. oligandrum* naturally colonizes the rhizosphere of grapevines, but this colonization does not depend on the type of soil that characterizes three vineyard sub-regions from the Bordeaux region. Neither does it depend on the global microbial populations colonizing the rhizosphere. Rootstocks or weeding management are, however, associated with various level of root colonization by the oomycete. Based on the sequencing of various genes, various genetic structures of *P. oligandrum* strains were observed, but they were not related to the isolation site of the oomycete.

The soil types and the microbiota associated with the rhizosphere of grapevines provided relevant information on the abiotic-biotic environment in which *P. oligandrum* strains grow. Differences in material compositions, *i.e.* sand, stones, silt and clay, are the main drivers of distinctness between these soils. This point is worth being mentioned because several authors (53,54,55,56,57) reported that soil type is one of the major abiotic factors affecting the structure of microbial communities in the rhizosphere. In our experiment, SSCP data indicate that the structure of rhizosphere fungal communities of plants growing in stony soils (Graves sub-region) was markedly different from those in the silty (Libournais) and sandy-stony (Médoc) soils. This result is in accordance with Balestrini *et al.* (58) and Fujita *et al.* (59) who show that soil type is the main factor shaping fungal structure in vineyards. Kandeler *et al.* (60) indicated that coarse sand size fractions (2,000–250  $\mu\text{m}$ ) were colonized

by fungi more than by clay (2–0.1  $\mu\text{m}$ ) and silt fractions (63–2  $\mu\text{m}$ ). However, as regards rhizosphere, our study showed there was less diversity in fungal communities of the rhizosphere from plants growing in the stony soils than in the two others, as calculated with the Simpson diversity index. As reported by Fujita *et al.* (59), fungal communities structure was more sensitive than the bacterial communities to environmental factors. This is also the case here because a clear cut-off between bacterial communities of the 3 viticulture regions was not observed for the bacteria. Sessitsch *et al.* (61) found that soil particles have an influence on the bacterial communities, with soils with coarse particles yielding lower microbial diversity than soils with small particles. The same observation on particle size was made by Badin *et al.* (62). The factors that drive microbial colonization in soils, such as finer size particles, provide a protective habitat for microorganisms through pore size exclusion of predators (protozoa) (63,64) or higher nutrient availability that cause higher bacterial diversities (61). However, as we focused on the bacterial communities that colonize the rhizosphere and not on soil particles only, the influence on microorganisms that colonize the rhizosphere should be limited. Diameters of particles certainly have a lesser influence on bacterial communities than when they grow in bare soil.

In our 2-year experiment, with the exception of one sampling out of 24, *P. oligandrum* strains were always isolated for the rhizosphere, and clear differences between vineyards within the same sub-region, or between the sub-3 regions, were not observed. These results differed from those obtained by Spies *et al.* (65) who studied *Pythium* and *Phytophthora* species associated with grapevines in South Africa. They identified 22 *Pythium* species, but they did not detect *P. oligandrum*. Several reasons could be proposed to explain this: (i) the use of different resistant rootstocks, since it was obvious in our experiment that some of them could facilitate or not the colonization of roots by *P. oligandrum*. (ii) The planting of cover

crops, such as wheat between rows in South African vineyards, can impact *Pythium* species colonization of roots. (iii) Weeding strategies through herbicide applications have an impact on *P. oligandrum* populations in Bordeaux region. The influence of fungicides in controlling powdery and downy mildews cannot be discarded either, although they did not prevent *P. oligandrum* root colonization of grapevines in the Bordeaux region. Spies *et al.* (65), mentioned that a fungicide programme has a significant effect on *Phytophthora* populations in South Africa, and should have a significant influence on *P. oligandrum* in their specific environment, but further studies need to be done to verify this point. All these factors, along with the different types of vineyard soil, climate and microbiota in South Africa and Bordeaux, could have contributed to inducing changes in the *Pythium* species diversity and meant that *P. oligandrum* was not detected by Spies and co-authors. The role of each factor still remains to be determined.

The abiotic or biotic factors we studied do not seem to display an influence on shaping the genetic diversity of *P. oligandrum*. This was observed after the sequencing of three genes, used for either identification or phylogeny, and six elicitor-like genes coding for elicitors. As regards phylogeny, most of the isolated *Pythium* strains with echinulated oospores were *P. oligandrum* (99% nucleotide identity) but among these strains very few nucleotide variations were observed in ITS region. *P. oligandrum* strains originating from UK, Denmark, Australia and Netherlands were genetically very close to those of the Bordeaux vineyards. The same kind of observation was made by Godfrey *et al.* (66) when they used strains from various origins, suggesting to them that *P. oligandrum* is a species with worldwide distribution, whose strains are closely related. Besides low divergence in ITS gene, cytochrome oxidase I and tubulin gene sequencings showed that strains clustered into three groups, but no correlation was found between *P. oligandrum* genotypes and the sub-region from which the

strains were isolated.

As regards elicitor-like genes, whose proteins are key components in inducing systemic resistance in plants, at least one gene of oligandrin (2 genes) and Cell Wall Protein (4 genes), were detected in all the *P. oligandrum* strains. Masunaka *et al.* (42) also detected these genes in *P. oligandrum* strains isolated from Japanese soils, suggesting that they are certainly frequent worldwide within this oomycete. Note, however, that in our study, variations within this family of genes were observed. Two types of oligandrin genes corresponding to Oli-D1 and Oli-S1 previously described by Masunaka *et al.* (42) were detected in all the *P. oligandrum* strains. It should be noted that the proteins deduced from the DNA sequences were similar and that the production of oligandrin quantities depended on the strains but not on their origin. Since oligandrin induces disease resistance in many plants, including young vines, it can be hypothesized that strains producing great quantities of oligandrin have a major effect on the plant induction of resistance. CWP gene sequencing revealed the presence of two genes similar to POD-1 and POS-1 genes as described by Masunaka *et al.* (42) and two new sequences named POD-1a and POD1-b. Interestingly, each deduced protein was distinct.

In our study, a great variability of elicitor-like genes among the *P. oligandrum* strains collected was observed. We create Elicitor Like Protein profiles (ELP) groups to determine the distribution of the elicitor-like sequenced genes within *P. oligandrum* strains. Six different ELP groups were obtained with a dominant one, ELP-1. Again, none of these 6 groups was assigned to a particular sub-region of the Bordeaux vineyards. However, these results suggest that, depending on the oligandrin and CWP genes, *P. oligandrum* strains' ability to stimulate plant defense mechanism should be different. However, our bioassay test, aimed at controlling *E. necator* on vine leaves, did not show any differences among ELP groups,

indicating that all the strains displayed the same ability in protecting plants. Further studies on the induction of resistance in grapevines should be carried out in order to determine which defense systems are preferably triggered or not *in planta* by the *P. oligandrum* strains of each ELP group.

In conclusion, the present study suggests that in vineyards cultivated in 3 sub-regions of the Bordeaux region, whose global fungal and bacterial communities may differ or not depending on the type of soil, and where the plants are regularly treated with pesticides, plant beneficial microorganisms such as the rhizospheric-colonizer oomycete, *P. oligandrum*, can frequently colonize the roots. Whatever the conditions in which *P. oligandrum* strains grow, external factors do not seem to shape the genetic structure of the oomycete. So, these results suggest that managing potentially rhizospheric-beneficial microorganisms in the vineyards is possible, provided that the factors favoring root colonization are applied. For instance, these results suggest that through managing plants (rootstocks in our case because they have an influence on root colonization), weeding management (herbicide treatment or not), it is possible to promote the root colonization by *P. oligandrum* population. Within that population, internal variations, particularly those observed in the elicitor genes, suggest that the induction of plant resistance is only linked to the type of *P. oligandrum* strains. Determining which factors favor specific genotypes could also be carried out. Based on the studies on this model microorganism, they should provide key information to manage other oomycete, fungi or bacteria that are useful for plant protection.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank French Agriculture Ministry for its financial support (Casdar research

programme on Grapevine Trunk Diseases). J. Gerbore was financially supported by the French Research and Technology Agency and Biovitis firm. The authors thank Michel Ponchet (INRA Sophia Antipolis, France) for kindly providing us oligandrin. The authors thank Ray Godfrey for the revision of the text.

## REFERENCES

1. **Galet P.** 1982. Les maladies et parasites de la vigne tome 2. Lavoisier, France.
2. **Bertsch C, Ramírez-Suero M, Magnin-Robert M, Larignon P, Chong J, Abou-Mansour E, Spagnolo A, Clément C, Fontaine F.** 2012. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathol.* **62**:243-265.
3. **Bruez E, Lecomte P, Grosman J, Doublet B, Bertsch C, Fontaine F, Ugaglia A, Teisseidre PL, Guerin-Dubrana L, Rey P.** 2013. Overview of the grapevine trunk diseases in France in the early 2000s. *Phytopathol. Mediterr.* **52**:262-275.
4. **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.
5. **Whitelaw-Weckert MA, Rahman L, Hutton RJ, Coombes N.** 2007. Permanent swards increase soil microbial counts in two Australian vineyards. *Appl. Soil. Ecol.* **36**:224-232.
6. **Steenwerth KL, Drenovsky RE, Lambert JJ, D.A. Kluepfel DA, Scow KM, Smart DR.** 2008. Soil morphology, depth and grapevine root frequency influence microbial communities in a Pinot noir vineyard. *Soil. Biol. Biochem.* **40**:1330-1340.
7. **Klemmer HW, Nakano RY.** 1964. Distribution and pathogenicity of *Phytophthora* and *Pythium* in pineapple soils of Hawaii. *Plant Dis. Rep.* **48**:848–852.
8. **Kobayasi Y, Matsushima T, Takada M, Hagiwara H.** 1977. Reports of Japanese mycological expedition to Mts Ruwenzori, Central-Africa. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.* **18**:64–94.
9. **Ribeiro WRC, Butler EE.** 1992. Isolation of mycoparasitic species of *Pythium* with spiny oogonia from soil in California. *Mycol. Res.* **96**:857-862.

10. **Schmitthenner AF.** 1962. Isolation of *Pythium* from soil particles. *Phytopathol.* **52**:1133-1138.
11. **Vaartaja O, Bumbieris M.** 1964. Abundance of *Pythium* species in nursery soils in South Australia. *Aust. J. Biol. Sci.* **17**:436-445.
12. **Ali-Shtayeh MS.** 1985. *Pythium* populations in Middle Eastern soils relative to different cropping practices. *Trans Br Mycol Soc* **84**:695–700.
13. **Mulligan DFC, Deacon JW.** 1992. Detection of presumptive mycoparasites in soil placed on host-colonized agar plates. *Mycol. Res.* **96**:605–608
14. **Plaats-Niterink AJVd.** 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Baarn, Netherlands.
15. **Martin FN, Hancock JG.** 1986. Association of chemical and biological factors in soils suppressive to *Pythium ultimum*. *Phytopathol.* **76**:1221–1231.
16. **Al-Rawahi AK, Hancock JG.** 1998. Parasitism and biological control of *Verticillium dahliae* by *Pythium oligandrum*. *Plant. Dis.* **82**:1100–1106.
17. **Le Floch G, Rey P, Déniel 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.
18. **McQuilken MP, Whipps JM, Cooke RC.** 1990. Control of damping-off in cress and sugar beet by commercial seed-coating with *Pythium oligandrum*. *Plant. Pathol.* **39**:452–462.
19. **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. *Phytopathol.* **98**:187–195.
20. **Mohamed N, Lherminier J, Farmer MJ, Fromentin J, Beno N, Houot V, Milat ML, Blein JP.** 2007. Defense responses in grapevine leaves against *Botrytis cinerea* induced

by application of a *Pythium oligandrum* strain or its elicitor, oligandrin, to roots. *Phytopathol* **97**:611-620

21. 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.* DOI 10.1007/s11356-013-1807-6.
22. Benhamou N, le Floch G, Vallance J, Gerbore J, Grizard D, Rey P. 2012. *Pythium oligandrum*: an example of opportunistic success. *Microbiol. SGM* **158**:2679–2694.
23. 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.
24. Picard K, Ponchet M, Blein JP, 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.
25. Rey P, Le Floch G, 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.
26. 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.
27. 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.
28. Rey P, Benhamou N, Wulff E, Tirilly Y. 1998. Interactions between tomato

- (*Lycopersicon esculentum*) root tissues and the mycoparasite *Pythium oligandrum*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* **53**:105–122.
- 29. Le Floch G, Benhamou N, Mamaca E, Salerno MI, 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.
- 30. 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.
- 31. 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.
- 32. Madsen AM, de Neergaard E.** 1999. Interactions between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and sclerotia of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Eur. J. Plant. Pathol.* **105**:761-768.
- 33. Rekanovic E, Miliijasevic S, Todorovic B, Potocnik I.** 2007. Possibilities of biological and chemical control of *Verticillium* wilt in pepper. *Phytoparasit.* **35**:436-441.
- 34. Takenaka S, Ishikawa S.** 2013. Biocontrol of sugar beet seedling and taproot diseases caused by *Aphanomyces cochlioides* by *Pythium oligandrum* treatments before transplanting. *Jpn. Agric. Res. Quarter.* **47**:75-83.
- 35. Alabouvette C, Olivain C, Steinberg C.** 2006. Biological control of plant diseases: the European situation. *Eur. J. Plant Pathol.* **114**:329–341.
- 36. Edel-Hermann V, Brenot S, Gautheron N, Aime S, Alabouvette C, Steinberg C.** 2009. Ecological fitness of the biocontrol agent *Fusarium oxysporum* Fo47 in soil and its impact on the soil microbial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* **68**: 37–45.

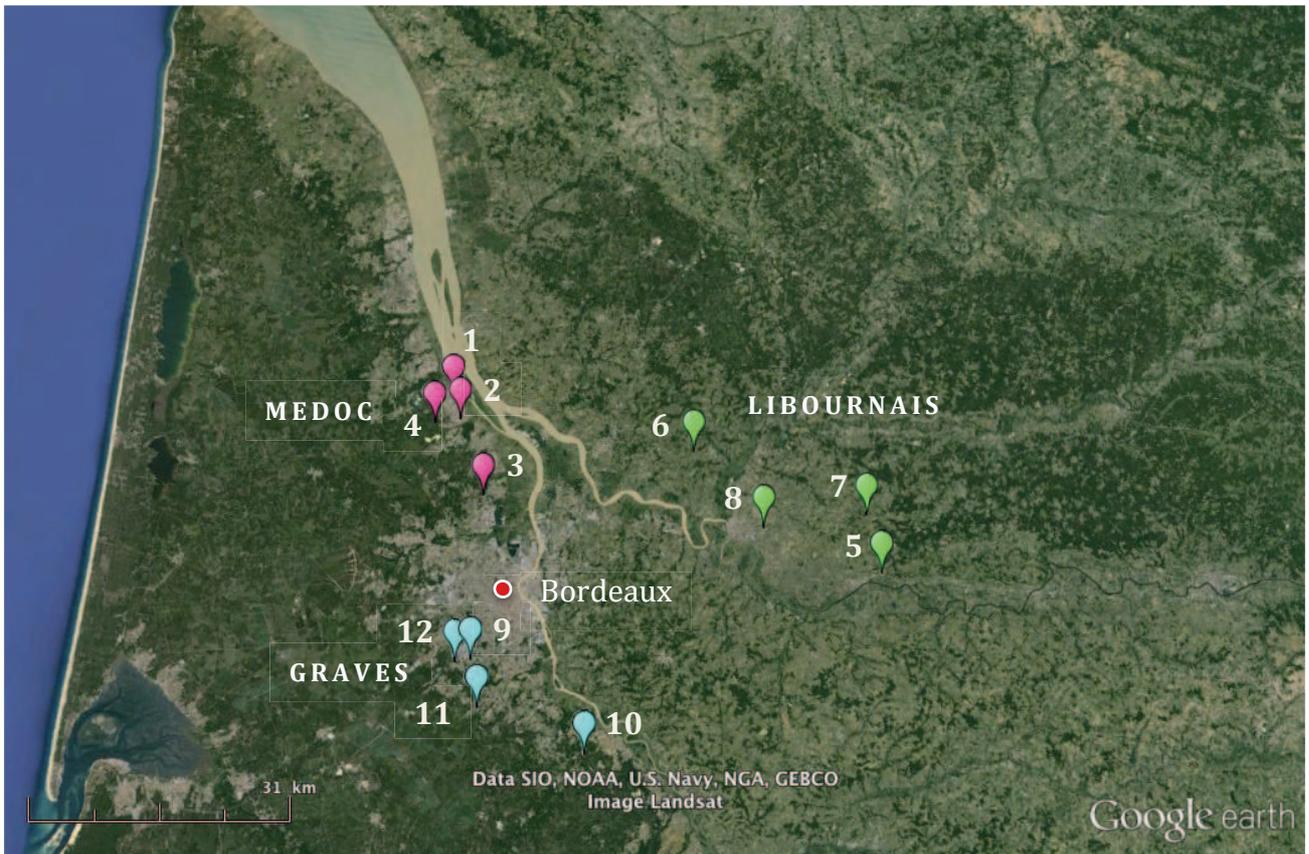
37. **Alabouvette C, Olivain C, Migheli Q, Steinberg C.** 2009. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New. Phytol.* **184**:529–544.
38. **Chacón MR, Rodríguez Galán O, Benítez Fernández T, Sousa S, Rey M, Llobell A, Delgado Jarana J.** 2007. Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by "*Trichoderma harzianum*". *Int. Microbiol.* **10**:19-28.
39. **Robertson MP, Kriticos DJ, Zacharades C.** 2008 Climate matching techniques to narrow the search for biological control agents. *Biol. Control.* **46**:442-452.
40. **Jeffers SN, Martin SB.** 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Dis.* **70**:1038-1043.
41. **Bakkeren G, Kronstad JW, and Levesque CA.** 2000. Comparison of AFLP fingerprints and ITS sequences as phylogenetic markers in Ustilaginomycetes. *Mycologia* **92**:510–521.
42. **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.
43. **Gadberry MD, Malcomber ST, Doust AN, Kellogg EA.** 2005. Primaclade - a flexible tool to find primers across multiple species. *Bioinformatics* **21**:1263-1264.
44. **Bala K, Robideau GP, Désaulniers N, de Cock AWAM, Lévesque CA.** 2010. Taxonomy, DNA barcoding and phylogeny of three new species of *Pythium* from Canada. *Persoonia* **25**:22–31.
45. **Gouy M, Guindon S, Gascuel O.** 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* **27**:221-224.
46. **Bonnet P, Bourdon E, Ponchet M, Blein JP, Ricci P.** 1996. Acquired resistance

- triggered by elicitors in tobacco and other plants. *Eur. J. Plant Pathol.* **102**:181–192.
47. **White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J.** 1990. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (eds.), New York, Academic Press, 315-322 pp.
48. **Redford AJ, Bowers RM, Knight R, Linhart Y, Fierer N.** 2010. The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environ. Microbiol.* **12**:2885-2893.
49. **Michelland RJ, Dejean S, Combes S, Fortun-Lamothe L, Cauquil L.** 2009. StatFingerprints : a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Mol. Ecol. Res.* **9**:1359-1363
50. **Kimsé M, Bayourthe C, Monteils V, Fortun-Lamothe L, Cauquil L, Combes S, Gidenne T.** 2012. Live yeast stability in rabbit digestive tract: Consequences on the caecal ecosystem, digestion, growth and digestive health. *Anim. Feed. Sci. Tech.* **173**:235-243.
51. **Michelland RJ, Combes S, Monteils V, Cauquil L, Gidenne T, Fortun-Lamothe L.** 2010. Molecular analysis of the bacterial community in digestive tract of rabbit. *Anaerobe* **16**:61–65.
52. **Onaindia M, Dominguez I, Albizu I, Garbisu C, Amezaga I.** 2004. Vegetation diversity and vertical structure as indicators of forest disturbance. *Forest. Ecol. Manag.* **195**:341-354.
53. **Buée M, De Boer W, Martin F, Van Overbeek L, Jurkevitch E.** 2009. The rhizosphere zoo: an overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant Soil* **321**:189-212.

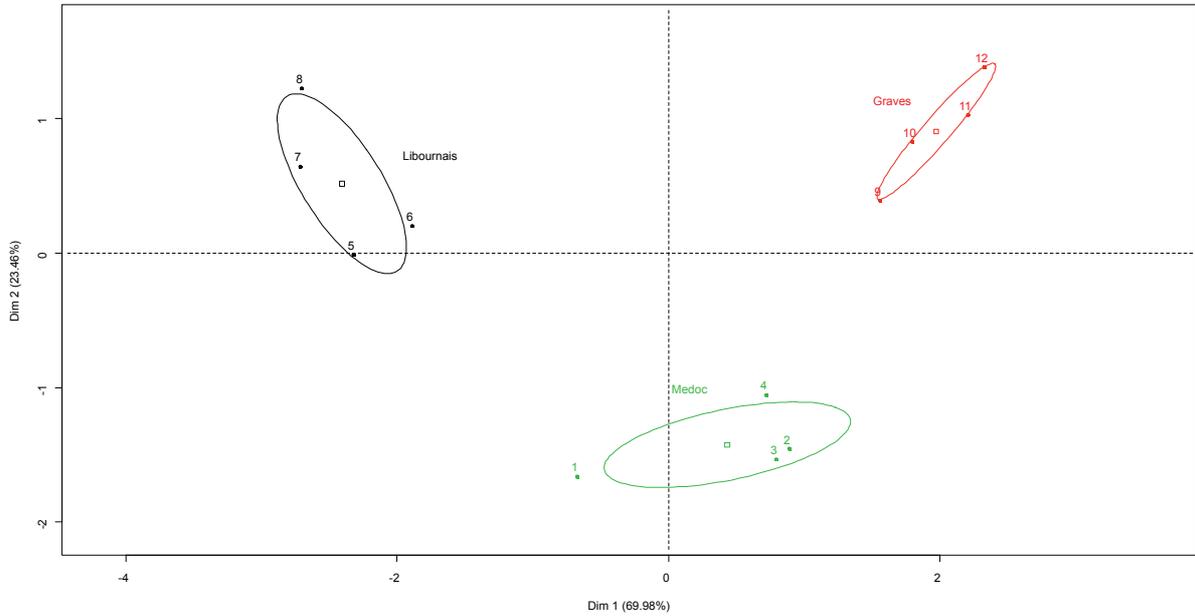
54. **Latour X, Corberand T, Laguerre G, Allard F, Lemanceau P.** 1996. The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2449–2456.
55. **Marschner P, Crowley DE, Yang CH.** 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant. Soil.* **261**:199–208.
56. **Mougel C, Offre P, Ranjard L, Corberand T, Gamalero E, Robin C, Lemanceau P.** 2006. Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different development stages of *Medicago truncata* Geartn. Cv. Jemalong line J5. *New. Phytol.* **170**:165–175.
57. **Viebahn M, Veenman C, Wernars K, van Loon LC, Smit E, Bakker PAHM.** 2005. Assessment of differences in ascomycete communities in the rhizosphere of field-grown wheat and potato. *FEMS Microbiol. Ecol.* **53**:245–253.
58. **Balestrini R, Magurno F, Walker C, Lumini E, Bianciotto V.** 2010. Cohorts of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in *Vitis vinifera*, a typical Mediterranean fruit crop. *Env. Microbiol. Rep.* **2**: 594-604.
59. **Fujita K, Furuya S, Kohno M, Suzuki S, Takayanagi T.** 2010. Analysis of microbial community in Japanese vineyard soils by culture-independent molecular approach. *Int. J. Wine Res.* **2**:75-104.
60. **Kandeler E, Tschерko D, Bruce KD, Stemmer M, Hobbs PJ, Bardgett RD, Amelung W.** 2000. Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. *Biol. Fert. Soils* **32**:390-400.
61. **Sessitsch A, Weilharter A, Gerzabek MH, Kirchmann H, Kandeler E.** 2001. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4215-4224.

- 62. Badin AL, Mustafa T, Bertrand C, Monier A, Delolme C, Geremia RA, Bedell, JP.** 2012. Microbial communities of urban stormwater sediments: the phylogenetic structure of bacterial communities varies with porosity. *FEMS Microbiol. Ecol.* **81**: 324-338.
- 63. Elliot ET, Anderson RV, Coleman DC, Cole CV.** 1980. Habitable pore space and microbial trophic interactions. *Oikos* **35**:327–335.
- 64. Postma J, van Veen JA.** 1990. Habitable pore space and survival of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* introduced into soil. *Microb. Ecol.* **19**:149–161.
- 65. Spies CFJ, Mazzola M, McLeod A.** 2011. Characterisation and detection of *Pythium* and *Phytophthora* species associated with grapevines in South Africa. *Eur. J. Plant. Pathol.* **131**:103-119.
- 66. Godfrey SC, Monds RD, Lash DT, Marshall JW.** 2003. Identification of *Pythium oligandrum* using species-specific ITS rDNA PCR oligonucleotides. *Mycol. Res.* **107**:790-6.

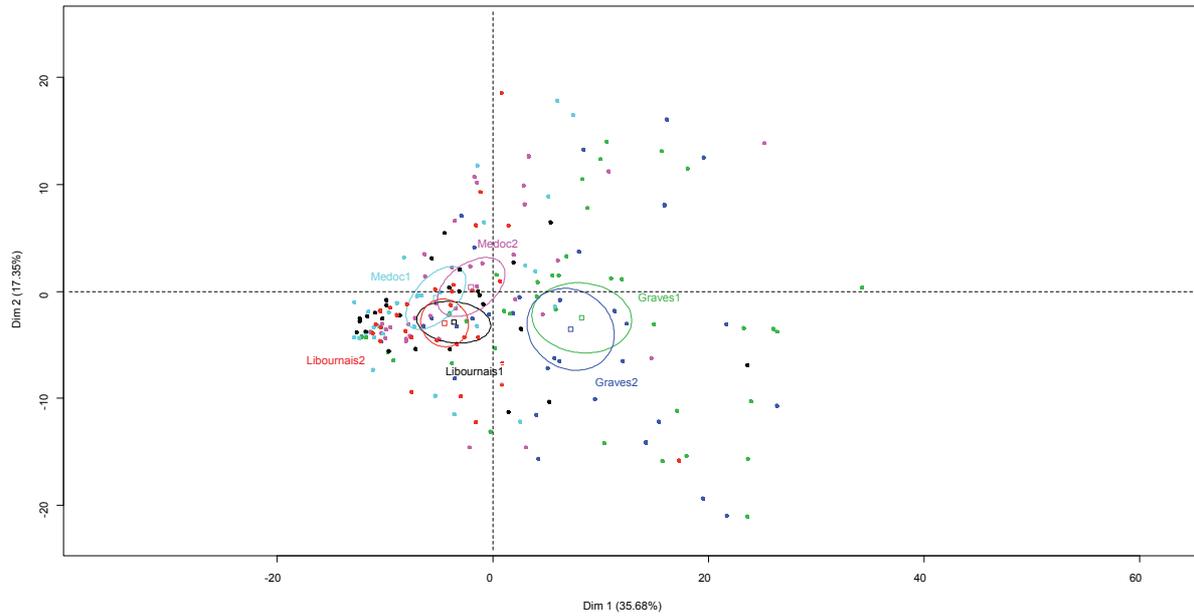
## TABLES AND FIGURES



**Figure 1.** Bordeaux region map with localization of the vineyards we used. Each mark and number indicate vineyards in which the samplings have been carried out. The 3 sub-regions of the Bordeaux region are indicated: green for Libournais sub-region, blue for Graves sub-region and pink for Médoc sub-region

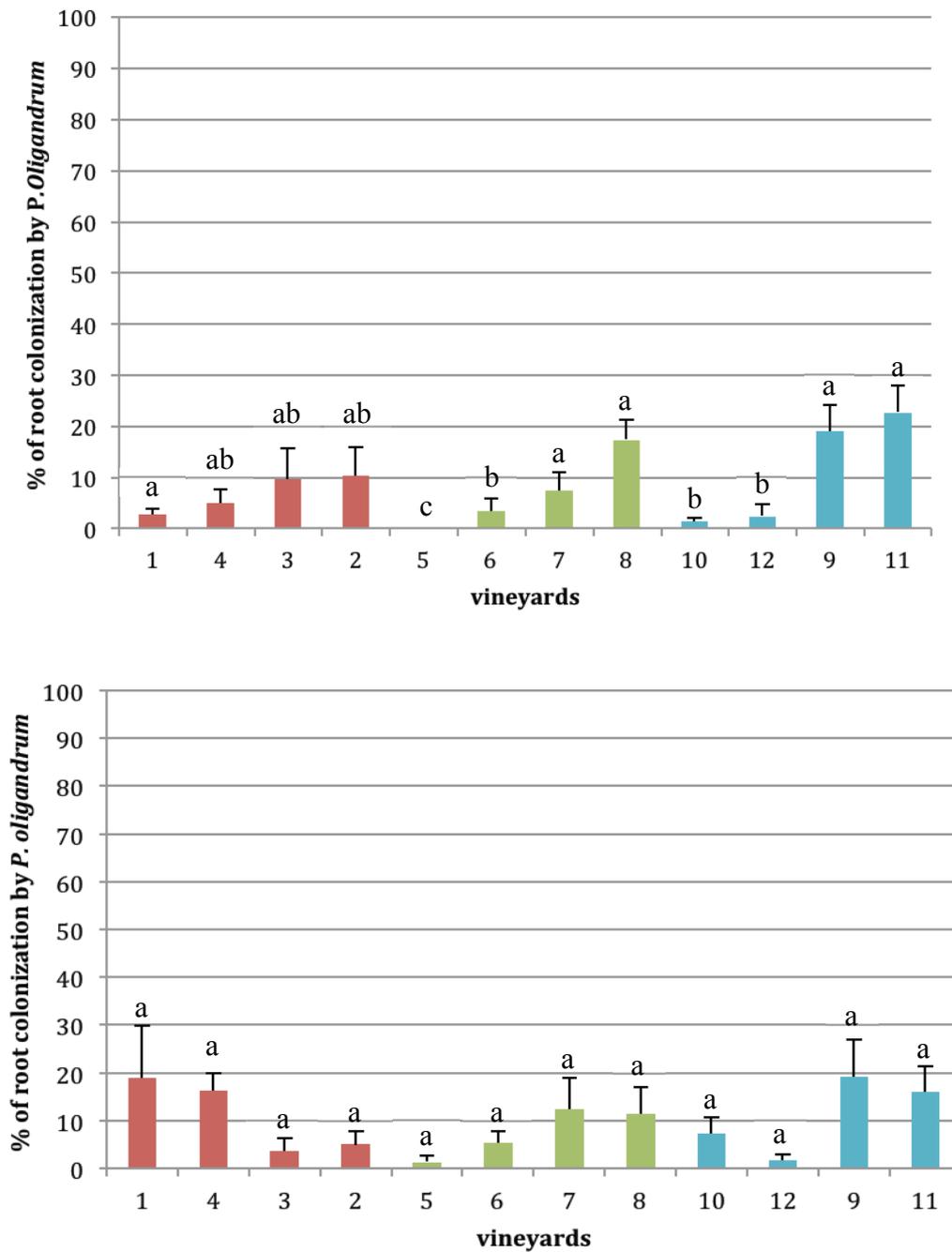


**Figure 2.** Comparison of vineyards from three regions of the Bordeaux vineyards (Graves, Libournais and Médoc) by Principal Component Analysis. To generate this PCA, percentage of clay, sand, silt and stone were used together with weeding management and rootstock data. Four vineyards were sampled per region (see Table 1 for correspondence number), Statistical ellipsoids drawn the center of factors with 95% confidence.

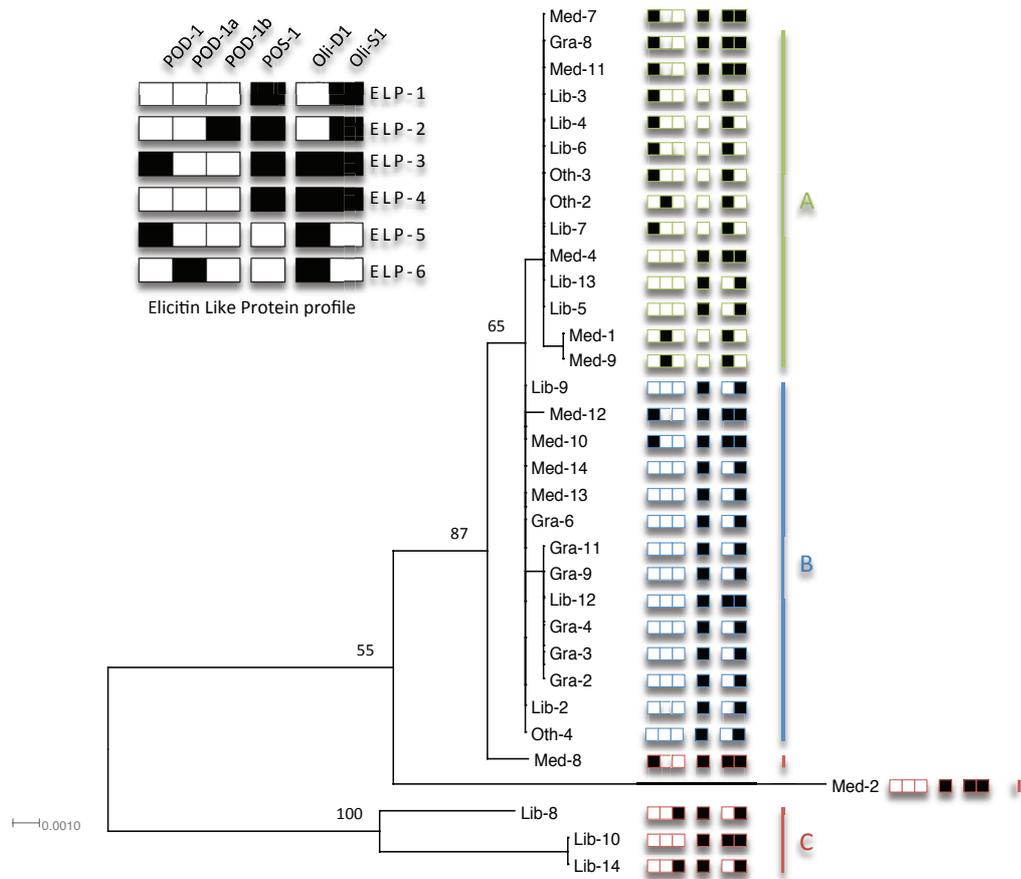


**Figure 3.** Comparison of genetic structure of rhizospheric fungal communities from roots of grapevines grown in Graves, Libournais and Médoc by Principal Component Analysis. The SSCP profiles of fungal communities is based on mitochondrial large-subunit rDNA gene. Ellipsoids draw the center of factors with 95% confidence. 1 = sampling in year 2010 and 2 = sampling in year 2011

**Figure 4.** Root colonization (%) of grapevines by *Pythium* spp. with echinulated-oospores assessed



by plate counting in summer 2010 and 2011. The values reported are means of 10 samples collected in each vineyard. Means with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  (ANOVA and test of Tukey). Red for Med = Médoc, green for Lib = Libournais, blue for Gra = Graves; these colours indicate the origin of the *Pythium* spp. with echinulated-oospores. The number refers to vineyards (see Table 1).



**Figure 5.** PhyM1 tree based on sequencing of Tubulin and Cytochrome c oxydase subunit 1 (COI) genes of *P. oligandrum* strains. Bootstrap values based on 1000 replications are indicated as percentages in the internode when replication frequencies exceed 50 %. Shaded boxes indicate the elicitin-like protein genes that are detected within the *P. oligandrum* strains names: POD-1, POD-1a, POD-1b, POS-1, Oli-D1, Oli-S1. Note that the legend for shaded boxes corresponding to the 6 Elicitin Like Protein profiles (ELP) is shown in the inset. Lib = Libournais, Med = Médoc, Gra = Graves; these abbreviations indicate the origin of the *P. oligandrum* strains.

Vineyard ID	Sub-region	coordinates		Year of Planting	Rootstock	Weeding management	Physical properties			
							silt (%)	clay (%)	sand(%)	stones (%)
1	Médoc	45°03'02"N	0°40'28.5"O	1988	3309	mecha	16	22	62	14.75
2	Médoc	45°01'32"N	0°39'46"O	1987	101-14	mecha	11	10	79	33.06
3	Médoc	44°56'36.5"N	0°37'27.8"O	1990	3309	chem	8	9	83	18.86
4	Médoc	45°01'42.3"N	0°39'48.4"O	1990	101-14	mecha	9	13	78	NA
5	Libournais	44°51'42"N	0°00'60"O	1987	101-14	chem	52	21	27	1.39
6	Libournais	44°59'29.5"N	0°18'07"O	1987	3309	none	55	14	31	2.61
7	Libournais	44°55'24"N	0°02'18"O	1987	NA	mecha	49	31	20	3.92
8	Libournais	44°54'37.5"N	0°11'43"O	1986	SO4	chem	51	35	14	16.87
9	Graves	44°46'12.5"N	0°38'15.5"O	1988	NA	mecha	14	6	80	38.98
10	Graves	44°40'26"N	0°27'53"O	1989	3309	mecha	13	8	79	49.81
11	Graves	44°43'15"N	0°37'34.5"O	1988	101-14	mecha	10	6	84	53.40
12	Graves	45°1'42.3"N	0°39'48.4"O	1988	NA	chem	10	7	83	58.72

**Table 1** - Characterization of the soils from 12 vineyards located in the Bordeaux region (France). We sampled vineyards from three main geographical subdivisions of the Bordeaux region: Graves, Libournais and Médoc (4 vineyards per sub-region). Physical properties of soils: all the values are expressed as percentages. Weeding management: mechanical (mecha) via plowing, chemical (chem) via herbicide treatments (two on average per year).

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon size (pb)
Cell Wall Protein	T1C <sup>a</sup> T1F <sup>a</sup>	<i>ACTAAGGAGGAGTGCACGCC</i> <i>TTAGCAGGCTGGCTTAGGGGTG</i>	516
Extracellular protein oligandrin	Oligandrin F <sup>a</sup> Oligandrin R <sup>a</sup>	<i>ATG TTCACCAAGACCTTGG</i> <i>TTAAGCGGAGCCAACCACGG</i>	365
rDNA ITS1 & ITS2 and 5,8s	UN-UP18s42 <sup>b</sup> UN-LO28S576B <sup>b</sup>	<i>CGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAAC</i> <i>CTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACG</i>	1600
Cytochrome oxidase I gene region	COI-Lev-up <sup>c</sup> FM85-mod <sup>c</sup>	<i>TCAWCWMGATGGCTTTTTTCAAC</i> <i>RRHWACKTGACTDATRATACCAA</i>	579
Tubulin	Jontub1 Jontub2	<i>ACYGGTGCTGGYAACTGG</i> <i>ACACACGCTTGAACATCTCCT</i>	850

**Table 2** - Primers used for molecular analysis.

<sup>a</sup>From Masunaka et al. (42), <sup>b</sup>From Bakkeren et al. (41), <sup>c</sup>Bala et al. (44)

**Table 3** - Simpson diversity indexes of bacterial and fungal communities colonizing the rhizosphere of grapevines from the vineyards of the 3 sub-regions of the Bordeaux region. Simpson indexes with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  (ANOVA and test of Tukey).

Year	Soil	Simpson index							
		Bacterial communities				Fungal communities			
2010									
	Graves	7.98	±	0.3	a	6.38	±	0.23	a
	Libournais	7.03	±	0.47	a	5	±	0.26	b
	Médoc	7.93	±	0.42	a	4.73	±	0.39	b
2011									
	Graves	7.93	±	0.3	a	6.48	±	0.22	a
	Libournais	7.6	±	0.36	a	5.57	±	0.15	b
	Médoc	7.69	±	0.32	a	5.54	±	0.16	b

**Table 4** - Influence of sampling sites (*i.e.* the 3 sub-regions), rootstocks and weeding managements on root colonization by *Pythium* spp. with echinulated-oospores. The values are means (%) of root colonization by *Pythium* spp. with echinulated-oospores. Means with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  (ANOVA and test of Tukey).

Abiotic factors	Years		
	2010	2011	
Localization of sampling sites			
	Médoc	7.00 a	11.00 a
	Libournais	7.00 a	7.58 a
	Graves	11.33 a	11.08 a
Rootstock			
	n° 3309	4.33 a	8.83 a
	n° 101-14	9.50 a	9.67 a
	SO4	17.33 b	11.33 a
Weeding management			
	Chemical	7.33 a	4.50 a
	Mechanical	9.81 a	13.62 b

**Table 5** - Polymorphic sites of nucleic acid and deduced amino acid sequences of genes coding for Cell Wall Proteins of *P. oligandrum*. Mutations of nucleic or amino acids are indicated in bold.

	<i>Polymorphic sites</i>									
	[114]	[116]	[233]	[243]	[255]	[280]	[286]	[292]	[357]	[400]
<i>Nucleic acid</i>										
POD-1	AAG	GAT	GAC	GAC	AAA	AAC	GGG	GTC	GCA	AGC
POD-1a	<b>AAC</b>	<b>GGT</b>	GAC	GAC	AAA	AAC	GGG	GTC	GCA	AGC
POD-1b	AAG	GAT	<b>GCC</b>	<b>GAT</b>	AAA	AAC	GGG	GTC	GCA	AGC
POS-1	AAG	GAT	<b>GCC</b>	<b>GAT</b>	AAC	<b>GAC</b>	<b>AGG</b>	<b>CTC</b>	<b>GAT</b>	<b>GGC</b>
<i>Amino acid</i>										
POD-1	Lys	Asp	Asp	Asp	Lys	Asn	Gly	Val	Ala	Ser
POD-1a	<b>Asn</b>	<b>Gly</b>	Asp	Asp	Lys	Asn	Gly	Val	Ala	Ser
POD-1b	Lys	Asp	<b>Ala</b>	Asp	Lys	Asn	Gly	Val	Ala	Ser
POS-1	Lys	Asp	<b>Ala</b>	Asp	<b>Asn</b>	<b>Asp</b>	<b>Ser</b>	<b>Leu</b>	<b>Asp</b>	<b>Gly</b>

**Table 6** - Elicitin Like Protein profiles (ELP) of *P. oligandrum* strains based on sequencing of Cell Wall Protein and oligandrin genes. Lib = Libournais, Med = Médoc, Gra =Graves, Oth = CBS strains; these abbreviations indicate the origin of the *P. oligandrum* strains.

	Cell Wall Protein				Oligandrin	
	<i>POD-1</i>	<i>POD-1a</i>	<i>POD-1b</i>	<i>POS-1</i>	<i>Oli-D1</i>	<i>Oli-S1</i>
<i>ELPP-1</i>						
Med-13	-	-	-	+	-	+
Med-14	-	-	-	+	-	+
Lib-2	-	-	-	+	-	+
Oth-4	-	-	-	+	-	+
Gra-11	-	-	-	+	-	+
Gra-12	-	-	-	+	-	+
Oth-1	-	-	-	+	-	+
Med-5	-	-	-	+	-	+
Lib-9	-	-	-	+	-	+
Lib-11	-	-	-	+	-	+
Lib-13	-	-	-	+	-	+
Lib-5	-	-	-	+	-	+
Gra-2	-	-	-	+	-	+
Gra-3	-	-	-	+	-	+
Gra-4	-	-	-	+	-	+
Gra-6	-	-	-	+	-	+
Gra-9	-	-	-	+	-	+
<i>ELPP-2</i>						
Lib-8	-	-	+	+	-	+
Lib-14	-	-	+	+	-	+
Gra-10	-	-	+	+	-	+
<i>ELPP-3</i>						
Med-12	+	-	-	+	+	+
Gra-5	+	-	-	+	+	+
Gra-8	+	-	-	+	+	+
Med-6	+	-	-	+	+	+
Med-7	+	-	-	+	+	+
Med-8	+	-	-	+	+	+
Med-10	+	-	-	+	+	+
Med-11	+	-	-	+	+	+
<i>ELPP-4</i>						
Lib-12	-	-	-	+	+	+
Lib-1	-	-	-	+	+	+
Lib-10	-	-	-	+	+	+
Med-2	-	-	-	+	+	+
Med-3	-	-	-	+	+	+
Med-4	-	-	-	+	+	+
<i>ELPP-5</i>						
Lib-3	+	-	-	-	+	-
Lib-4	+	-	-	-	+	-
Lib-6	+	-	-	-	+	-
Lib-7	+	-	-	-	+	-
Gra-1	+	-	-	-	+	-
Gra-7	+	-	-	-	+	-
Oth-3	+	-	-	-	+	-
<i>ELPP-6</i>						
Med-1	-	+	-	-	+	-
Med-9	-	+	-	-	+	-
Oth-2	-	+	-	-	+	-

**Table 7** - Oligandrin production by *P. oligandrum* strains. The values reported are means of at least three independent replicates. Different means with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  (according to ANOVA and Tukey test). Lib = Libournais, Med = Médoc, Gra = Graves, Oth = CBS strains; these abbreviations indicate the origin of the *P. oligandrum* strains.

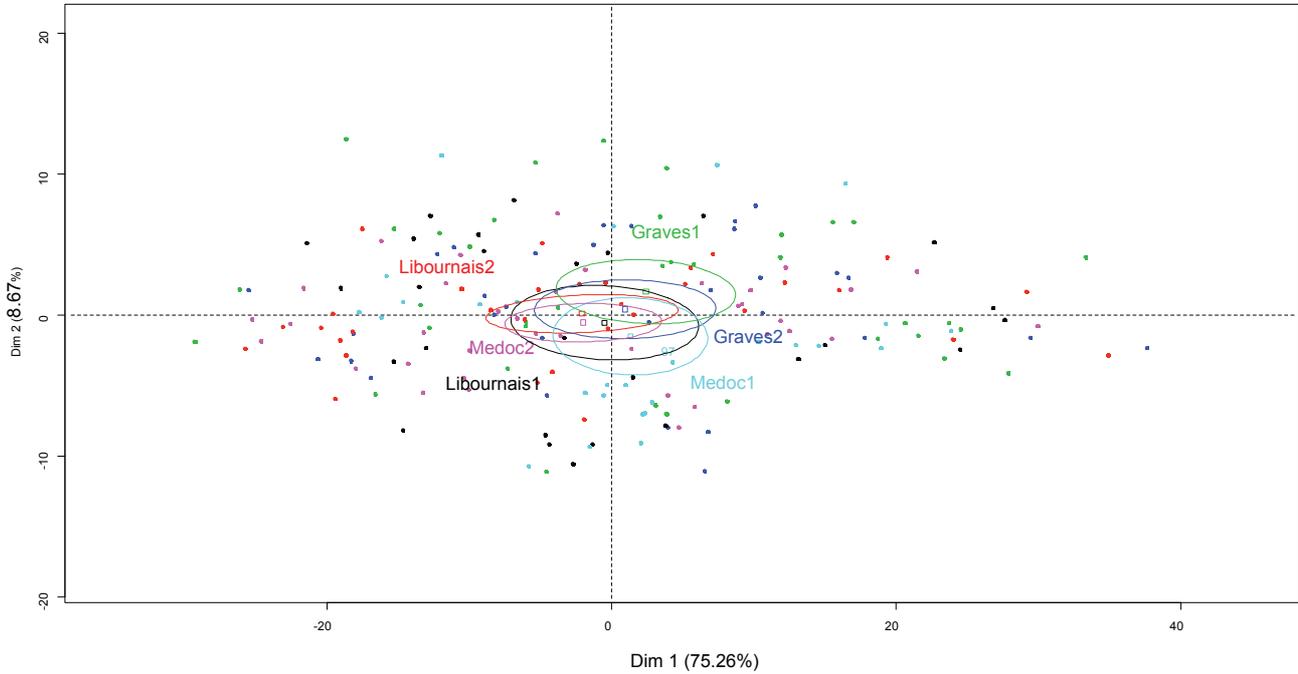
Strain	Oligandrin (mg/l)		
Lib-14	123.81	± 20.49	a
Oth-3	100.07	± 21.13	ab
Med-13	98.64	± 18.96	abc
Gra-6	98.40	± 19.60	abcd
Med-6	90.90	± 4.42	abcd
Med-7	86.67	± 0.53	abcd
Gra-1	81.10	± 5.39	abcd
Gra-11	77.66	± 6.12	abcd
Gra-7	65.85	± 7.77	bcd
Med-4	64.47	± 14.00	bcd
Oth-4	63.92	± 6.49	bcd
Med-12	61.26	± 13.45	bcd
Oth-2	61.08	± 6.68	bcd
Gra-7	56.36	± 5.28	bcd
Med-8	54.84	± 9.18	bcd
Lib-5	38.31	± 10.21	d
Med-11	31.36	± 2.26	d
Med-2	31.36	± 1.97	d
Med-1	24.05	± 4.90	d

**Table 8** - Oligandrin production by *P. oligandrum* strains belonging to the 6 ELP profiles. At least 2 repetitions per genetic profile have been carried out. Mean values (± standard error) with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  (according to ANOVA and Tukey test). ELP= Elicitin Like Protein group.

Genetic profile	Oligandrin (mg/l)		
ELP-2	123.8	± 20.5	a
ELP-5	73.8	± 6.7	ab
ELP-1	75.3	± 6.8	abc
ELP-3	67	± 6.8	bcd
ELP-4	38.8	± 15.9	cd
ELP-6	34.6	± 7.4	d

**Table 9** - Assessment of *Erysiphe necator* inhibition on leaves treated by *P. oligandrum* culture filtrates, oligandrin, or distilled water (control). ELP = Elicitin Like Protein group. The disease was determined by pathogen leaf coverage and spore production 12 days after inoculation (14 replicates per treatment, one strain per treatment), the experiment was repeated twice. Mean values (± standard error) with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  (according to ANOVA and Tukey test).

Genetic profile	Mean of leaf coverage (%)			Mean of pathogen sporulation		
ELP-1	55	± 9	ab	1118	± 262	a
ELP-2	38	± 6	b	774	± 216	a
ELP-3	30	± 4	b	827.7	± 97	a
ELP-4	67	± 6	a	1366	± 149	a
ELP-5	47	± 8	ab	1269	± 167	a
ELP-6	42	± 7	ab	677	± 156	a
Control	96	± 1	c	2276	± 271	b
Oligandrin	53	± 8	ab	1049	± 140	a



Supplementary material Figure 1 Comparison of genetic structure of rhizospheric bacterial communities from roots of grapevines grown in Graves, Libournais and Médoc subregions by Principal Component Analysis. The SSCP profiles of bacterial communities is based on 16s rRNA gene. Ellipsoids draw the center of factors with 95% confidence. 1 = sampling in year 2010 and 2 = sampling in year 2011.

### Points importants du chapitre:

A la lumière des travaux de cette publication, différents points sont à souligner.

Dans un premier temps, durant les 2 années d'expérimentation, les prélèvements effectués dans 12 vignobles bordelais ont permis d'isoler fréquemment, et à des taux relativement identiques d'une année à l'autre, des souches de l'agent de biocontrôle *P. oligandrum* dans la rhizosphère des mêmes ceps échantillonnés. Ce micro-organisme semble donc écologiquement adapté à l'environnement de ces vignobles puisqu'il a été retrouvé dans les régions viticoles du Médoc, de l'Entre-Deux Mers et des Graves, chacune ayant un type de sol qui lui est spécifique.

Ce point est important car cette étude a également souligné que le type de sol peut influencer les communautés microbiennes de la rhizosphère. En effet, l'analyse par empreinte moléculaire (SSCP) de la communauté fongique globale a montré des différences selon que les échantillons de racines provenaient de sols graveleux (région des Graves), argilo-calcaires (Entre-Deux Mers) et sablo-graveleux (Médoc). A l'inverse, pour les communautés bactériennes, aucune différence n'a été observée entre les 3 régions. L'influence de la texture du sol sur les communautés microbiennes de la rhizosphère est donc à considérer même si pour l'instant les mécanismes mis en jeu ne sont pas complètement élucidés.

Dans ce contexte tellurique abiotique et biotique, la prépondérance des souches de *P. oligandrum* parmi les *Pythium* aux oospores échinulées a été mise en évidence par méthode culturale et séquençage de la région ITS. L'analyse de gènes codant pour la cytochrome oxidase I et une tubuline a permis de constituer 3 groupes de souches de *P. oligandrum*. Le séquençage d'autres gènes codant pour les élicitines-like protéines a confirmé qu'au moins un gène codant pour chacun des 2 types d'éliciteurs de *P. oligandrum* (*i.e.* oligandrine et Cell Wall Protein) étaient présents dans chaque souche. Six groupes ont alors pu être formés avec ces gènes élicitines-like. Mais aucun de ces 2 types de groupes n'était associé à une région viticole particulière. Il semble donc que le type de sol et la microflore de la rhizosphère, n'exercent pas une influence suffisante pour que la structure génétique des populations de *P. oligandrum* soit associée à un contexte tellurique particulier. Il a par contre été observé que le type de porte-greffe et la méthode de désherbage (chimique ou mécanique) favorisaient ou non la colonisation racinaire par *P. oligandrum*.

Selon les souches, des différences ont été observées en terme de production d'oligandrine. Ce résultat suggère que ces souches de *P. oligandrum* possèdent des capacités d'induction de résistance variables. Le traitement de disques foliaires de vigne par

un filtrat de culture de *P. oligandrum* contenant de l'oligandrine a permis de réduire l'attaque de l'agent responsable de l'oïdium, *Erysiphe necator*. Par contre, les niveaux d'efficacité n'ont pas été significativement différents selon les profils génétiques des souches, ce qui indique que l'induction de résistance n'est pas totalement dépendant de la quantité d'oligandrine émise par les souches de *P. oligandrum*.

L'ensemble de ces résultats montre que *P. oligandrum* a un potentiel très intéressant comme agent de biocontrôle chez la vigne : il est adapté à cette culture et il est capable d'induire une résistance contre l'oïdium. Il apparaît donc intéressant de caractériser plus finement l'interaction entre la vigne et ce micro-organisme.

# 4

## Chapitre

# Etude transcriptomique de l'interaction *Vitis vinifera* / *P. oligandrum*

## Introduction

Lors du chapitre précédent, l'aptitude de souches de *P. oligandrum* à coloniser naturellement les racines de ceps du vignoble Bordelais a été démontrée. Ces souches du fait de la présence de gènes codant pour des protéines élicitrices ont potentiellement une capacité à activer les systèmes de défense des plantes. Cette propriété intrinsèque au génome de l'oomycète est aussi due aux relations qu'il établit avec les plantes. Les premières étapes de cette interaction ont été étudiées par Le Floch *et al.* (2005) and Rey *et al.* (1998a), et sa spécificité a été mise en évidence. Cette relation a été qualifiée d'atypique car elle diffère de l'ensemble des relations plante / *Pythium* et plante / agent de biocontrôle décrites dans la littérature scientifique (Benhamou *et al.* 2013 ; Rey *et al.* 2008).

Parmi les aspects spécifiques de cette relation, il est possible de citer :

(1) *La pénétration de P. oligandrum dans les tissus racinaires.* Alors que les espèces de *Pythium* spp. non pathogènes connues n'ont pas la capacité de pénétrer dans les racines (Rey *et al.* 1998b), *P. oligandrum* semble exercer une forte pression sur les parois et produit de façon très limitée et ciblée les enzymes nécessaires qui vont faciliter sa pénétration dans les tissus racinaires. Cette colonisation intra-racinaire se fait de façon aussi rapide que celles observées chez les espèces de *Pythium* spp. pathogènes décrites (Le Floch *et al.* 2003b ; Rey *et al.* 1996).

(2) *L'absence de dommages au niveau cellulaire.* Un point important est que la progression rapide de *P. oligandrum* dans les différents tissus racinaires, l'épiderme, le parenchyme

cortical ou l'endoderme, ne s'accompagne pas de désordres significatifs au niveau de la plante (Le Floch *et al.* 2003a; Rey *et al.* 1998a). Les observations en microscopie électronique à transmission (MET) réalisées par Le Floch *et al.* (2003a) de tissus racinaires de tomate montrent que les hyphes de *P. oligandrum* peuvent (a) coloniser rapidement (0-12 heures) et profondément la zone corticale racinaire sans créer de dommages. Ainsi, à la différence des espèces de *Pythium* pathogènes, l'émission d'enzymes chez *P. oligandrum* n'est jamais associée avec une dégradation conséquente des parois cellulaires de la plante. (b) Les hyphes de *P. oligandrum* vont dégénérer à la 12<sup>ème</sup> heure, ce phénomène étant associé à l'élaboration de quelques réactions de défense par le végétal (12-48 heures) et (c) survivre uniquement à l'extérieur de la racine à partir de 72 heures, des oogones sont alors observées dans la rhizosphère.

Les travaux de Le Floch *et al.* (2009) ont confirmé l'originalité de l'interaction plante / *P. oligandrum* lors d'un essai comparatif ayant pour objectif d'étudier les relations établies par des agents de biocontrôle avec des plants de tomate. Il a ainsi été clairement montré que l'interaction plante / *P. oligandrum* se distingue des interactions plante / *T. harzianum* et plante / *F. oxysporum* (souche Fo47) au niveau de plusieurs aspects touchant notamment à la progression dans les tissus racinaires (*T. harzianum* et Fo47 restant limités au cortex externe) et à la réponse de la plante hôte. Des réactions rapides et fortes du végétal sont extemporanément mises en place suite à la pénétration des hyphes de *T. harzianum* et Fo47 dans les tissus racinaires, ce qui n'est pas le cas avec *P. oligandrum* (Benhamou *et al.* 2001; Benhamou *et al.* 2002; Harman *et al.* 2004; Olivain et Alabouvette 1997, 1999; Olivain *et al.* 2006; Yedidia *et al.*, 1999).

Wulff *et al.* (1998) ont montré que cette étape initiale a un coût énergétique pour la plante. Ainsi, lorsque de jeunes plants de concombre sont colonisés par *P. oligandrum*, une réduction de croissance était observée les 3 premiers jours. Par contre, à partir du 4<sup>ème</sup> jour, ces auteurs rapportent une augmentation de croissance du système racinaire. Au final cette interaction a un effet positif sur la croissance des jeunes plants mais aussi sur la résistance aux agents pathogènes. Cette dernière propriété a été particulièrement décrite dans la littérature et la régulation de certains gènes dans l'interaction *P. oligandrum* / plante / pathogène, classiquement les gènes associés aux réactions de défenses, ont été étudiés (Hase *et al.* 2006, 2008; Kawamura *et al.* 2009 ; Mohamed *et al.* 2007 ; Takahashi *et al.* 2006; Takenaka *et al.* 2003). Ces expérimentations sont centrées sur les réponses de la plante suite à l'attaque par un agent pathogène. Ainsi *P. oligandrum* active les voies de signalisation de l'acide jasmonique (JA) et de l'éthylène lorsque la résistance du végétal aux maladies se met en place. Par contre, la troisième principale voie de signalisation, celle de

l'acide salicylique, ne semble pas induite (Hase *et al.* 2008 ; Takahashi *et al.* 2006).

Les interactions entre les plantes et les agents microbiens sont complexes et régies par un « dialogue » moléculaire entre eux. La reconnaissance d'éliciteurs généraux et d'effecteurs (les PAMPs, Pathogen-Associated Molecular Patterns), par exemple des oligomères de chitine ou de  $\beta$ -glucanes, des glycoprotéines comme la cryptogéine (Lyon, 2007), déclenche des cascades de réactions chez la plante conduisant à l'activation de certaines voies de signalisation associées à la production de composés antimicrobiens. Afin d'appréhender cette complexité, le champ de la génomique et plus précisément les techniques d'étude des transcriptomes sont des outils puissants qui permettent de suivre simultanément des milliers de gènes et leurs régulations transcriptionnelles. Dans le cas présent, compte tenu de l'originalité de l'interaction entre *P. oligandrum* et la plante, il nous est apparu intéressant d'approfondir les connaissances sur ce point, en particulier celles concernant la plante utilisée dans ces travaux de thèse, la vigne, en utilisant une approche globale par analyse transcriptomique. Les précédentes études portant sur la relation entre *P. oligandrum* et la plante hôte avaient été principalement réalisées via l'observation des modifications cytologiques en MET et par caractérisation biochimique de molécules antimicrobiennes, *i.e.* quantification d'une phytoalexine, la rishitine, et des phénols totaux (Le Floch *et al.* 2005 ; Rey *et al.* 1997). Elles avaient fourni pour la première fois des informations pertinentes et novatrices sur ce type de relations, la présente étude permettra d'obtenir une vue plus globale et approfondie des modifications physiologiques associées à cette interaction atypique, entre un agent opportuniste symbionte de plante (*P. oligandrum*), comme l'ont nommé Rey *et al.* (2008) et Benhamou *et al.* (2013), et les racines de *V. vinifera*.

#### *Description de la technique de microarray*

La transcriptomique est l'étude de l'ensemble des ARN messagers (ARNm) issus de la transcription du génome, regroupés sous le vocable de transcriptome. Elle repose sur l'étude des ARNm, ce qui donne une indication relative sur le taux de transcription de nombreux gènes, et permet de détecter les gènes actifs dans un tissu et les modifications de l'activité cellulaire selon les conditions environnementales. Plusieurs techniques permettent ces études, *i.e.* la PCR quantitative, le séquençage haut débit des ARNm (appelée aussi RNAseq) ou encore les puces à ADN (ou microarrays). Ces deux dernières techniques sont complémentaires et permettent des analyses de génomique fonctionnelle à haut débit (Malone et Oliver, 2011). Dans le premier cas, celui du RNA seq, tous les ARN sont analysés, un ensemble de séquences issues du génome de la plante mais aussi de celui du

ou des micro-organismes présents dans les tissus végétaux étudiés est obtenu. Dans le cas des micro-arrays ADN (Schena *et al.* 1995), leurs utilisations devient de plus en plus pertinentes car les séquences de génomes entiers de plantes sont disponibles (plus d'une vingtaine en 2011 d'après genomevolution.org). D'autre part, des outils analytiques bioinformatiques performants sont disponibles. Généralement, un transcriptome précis est ciblé, dans notre cas celui de la vigne sera utilisé, le séquençage du génome de *Vitis vinifera* (504.6 Mb, 30 000 gènes environ) ayant été réalisé par Jaillon *et al.* en 2007 avec le cépage Pinot Noir « clone ENTAV 115 ». Chez la vigne, la technologie microarray a été utilisée lors de l'interaction avec *Eutypa lata*, (Camps *et al.* 2010 ; Damiani *et al.* 2012; Hren *et al.* 2009 ; Rotter *et al.* 2009) mais aussi avec *Plasmopara viticola* (Polesani *et al.* 2010 ; Marchive *et al.* 2013), le phytoplasme du bois noir (Hren *et al.* 2009 ; Albertazzi *et al.* 2009) et *Erysiphe Necator* (Fung *et al.* 2008).

Pour les microarrays vigne, il existe deux technologies commerciales, Nimblegen et Affymetrix. 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, la plupart ayant une existence confirmée dans les banques dites Expressed Sequence Tag (EST).

Bien que plusieurs protocoles existent, les bases techniques des microarrays ADN sont communes. Le principe général des microarrays est présenté dans la figure 1 :

(1) les ARN totaux sont d'abord extraits pour chaque modalité à comparer, puis une étape de Rétro-Transcription transforme les ARN en ADN complémentaire (ADNc). Les échantillons sont marqués avec un fluorochrome puis hybridés (3) avec les sondes spécifiques de gènes placés individuellement sur les spots d'une lame de verre (2) (Kar Chun Tan *et al.* 2009). Après hybridation, un scanner laser mesure l'intensité relative de fluorescence de chaque spot pour chaque sonde. Pour un gène donné, les niveaux de fluorescence sont alors comparés (4) entre les modalités étudiées et les différences d'intensité indiquent une surexpression ou une répression du gène (Kar Chun Tan *et al.* 2009). Les données sont normalisées (5) et après traitement statistique, les catégories fonctionnelles de gènes différentiellement exprimés sont identifiées (6).

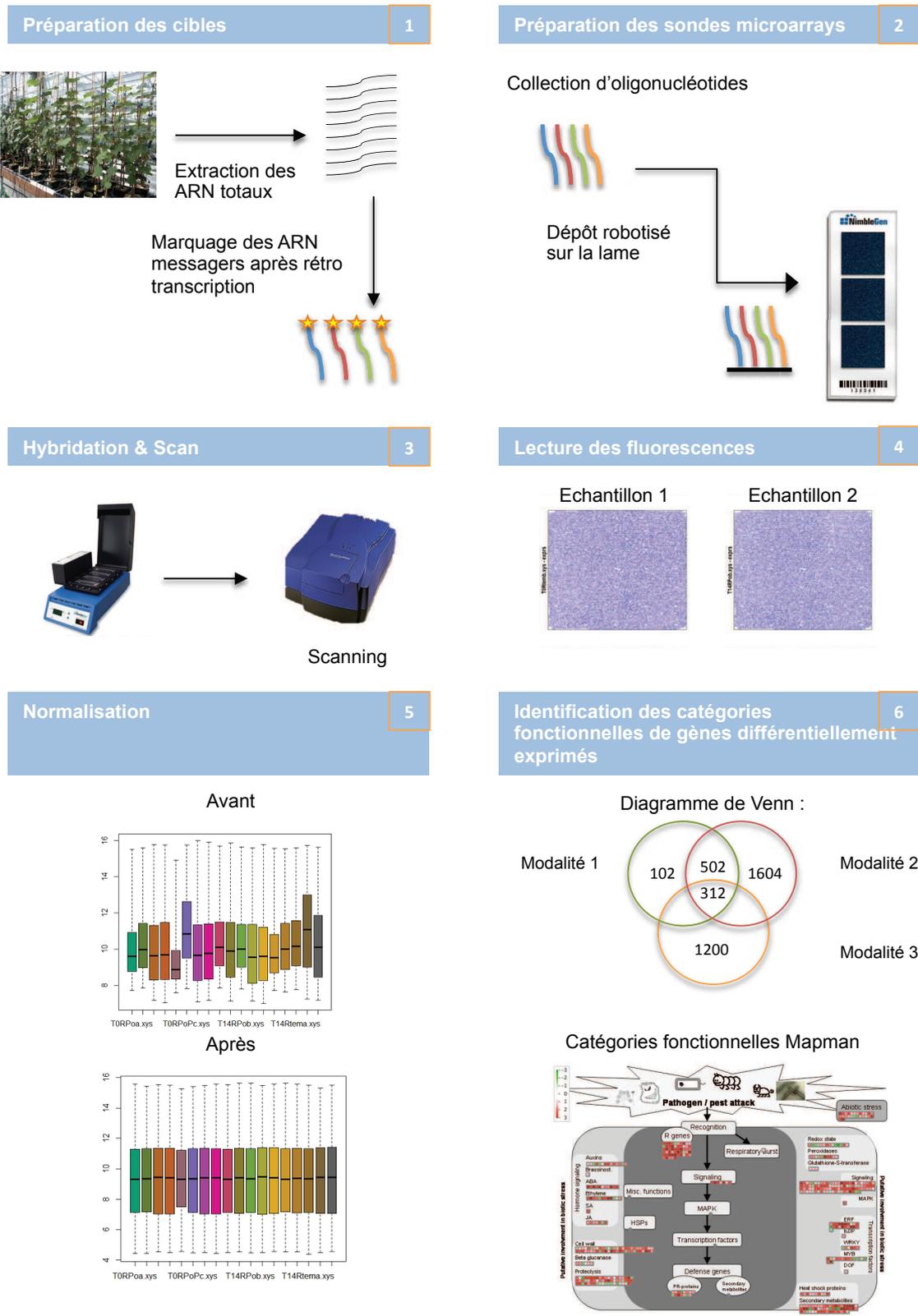


Figure 1 Principe général de l'analyse par microarrays.

## Matériels et Méthodes

### Culture des oomycètes

Quatre souches de l'oomycète *P. oligandrum*, ont été utilisées dans cette étude. Trois proviennent de la collection Centraalbureau voor Schimmelcultures au Pays-Bas (CBS 530.74, CBS 109982 et CBS 118746) et une de la souchothèque de l'UMR SAVE (nommée P5, SAVE, INRA, Bordeaux, France) (tableau 1). Ces souches ont été sélectionnées car au début de l'expérimentation réalisée sous serre, elles étaient purifiées, caractérisées au niveau moléculaire et disponibles pour la production d'inoculum en quantité importante, contrairement aux autres souches décrites dans le chapitre 3.

Les oomycètes ont été cultivés sur un milieu synthétique à base de farine de maïs gélosée, supplémenté d'antibiotiques (codé CMA-PARP, Jeffers et Martin, 1986). Les micro-organismes ont été placés en croissance dans une enceinte régulée à 25 °C et à l'obscurité.

Tableau 1 Origine des souches de *Pythium oligandrum* utilisées dans cette étude.

Souche	Code	Habitat	Origine
<i>Pythium oligandrum</i>	P5	Vigne	France
<i>Pythium oligandrum</i>	CBS 109982	Racine de chou chinois	Danemark
<i>Pythium oligandrum</i>	CBS 118746	Racine de courgette	Australie
<i>Pythium oligandrum</i>	CBS 530.74	Sol	Pays-Bas

### Dispositif expérimental

Des boutures de Cabernet Sauvignon certifiées par la Chambre d'Agriculture de Gironde, *Vitis vinifera* clone 169, au stade de croissance dit « deux-yeux » ont été placées pendant 2 mois en croissance en serre en conditions contrôlées dans un terreau composé de tourbe blonde extraite en bloc et d'argile granulée, avant inoculation par les souches de *P. oligandrum*. La température était de 25°C (+/- 3°C), la photopériode était en moyenne de 16 heures de jour et 8 heures d'obscurité. Un système de goutte à goutte avec fertilisation en continue (solution nutritive N/P/K 20/20/20) (2 L.h<sup>-1</sup>) a permis d'apporter quotidiennement de l'eau pendant 2 minutes au niveau du système racinaire. L'expérimentation a été réalisée en 2010, puis renouvelée en 2011. Pour chaque modalité, 90 boutures ont été utilisées. Les boutures ont été placées en randomisation totale comprenant trois blocs, avec 3 répétitions

par traitement (30 boutures par répétitions). Trois modalités ont été mises en place : (1) des plants inoculés au niveau des racines par l'inoculum n°1 de *P. oligandrum* (mélange des 2 souches, CBS 530.74 et CBS 109982), (2) par l'inoculum n°2 de *P. oligandrum* (mélange des 2 souches, CBS 118746 et P5), (3) des plants témoins non inoculés par *P. oligandrum*.

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

Les inocula n°1 et 2 constitués de mélanges d'oospores et de mycélium ont été préparés par la société BIOVITIS S.A. (Saint-Etienne-de-Chomeil). Il a été choisie d'utiliser un mélange de souches de *P. oligandrum* afin d'optimiser la colonisation de la rhizosphère des jeunes plants de vigne par l'agent de biocontrôle. L'intérêt de cette approche a déjà été développé par Vallance *et al.* (2009). Brièvement, *P. oligandrum* a été cultivé dans un milieu liquide à base de mélasse, comme décrit par Le Floch *et al.* (2003a) puis mis en croissance à l'obscurité à 24°C pendant 14 jours. La concentration pour chaque souche était de  $2 \times 10^4$  oospores par ml. Lorsque les boutures de vigne ont été au stade 7-8 feuilles, elles ont été inoculées en versant au niveau du système racinaire une première fois 50 ml d'inoculum, puis trois jours plus tard 40 ml d'inoculum. L'apport d'un inoculum en deux temps permet d'optimiser la colonisation de la rhizosphère.

### **Prélèvement des échantillons végétaux**

Chaque année, des prélèvements de racines ont été réalisés au cours de l'essai durant une période d'environ 4 mois (périodes de août à mi-décembre en 2010 et de juillet à octobre en 2011). Cinq prélèvements ont été réalisés : T0 (soit avant l'inoculation par *P. oligandrum*), T+7 jours (soit 7 jours après l'inoculation par *P. oligandrum*), T+21 jours, T+35 jours, T+63 jours et T+121 jours. Neuf boutures par modalité (3 plants \* 3 répétitions) ont été prélevées à chaque date. Une partie des échantillons de racines a été utilisée le jour même pour des analyses par méthode culturale afin d'évaluer l'implantation de *P. oligandrum* au niveau des racines ; l'autre partie a été congelée à -80°C pour les analyses en transcriptomique afin d'étudier les réponses de la plante à la colonisation racinaire par *P. oligandrum*.

### **Evaluation de l'implantation de *P. oligandrum* au niveau des racines par méthode culturale**

Comme indiqué ci-avant, la colonisation des racines par *P. oligandrum* a été régulièrement évaluée par méthode culturale. Lors de chaque prélèvement, pour chaque plant, 20 fragments racinaires ont été aléatoirement prélevés, déposés sur un milieu sélectif (milieu CMA-PARP, Jeffers et Martin, 1986) et incubés à 25°C à l'obscurité pendant 10-12

jours. A la suite de cette période, pour chaque fragment racinaire, la présence ou non d'oospores échinulées (Plaats-Niterink, 1981) a été recherchée au microscope optique et la fréquence moyenne d'isolement a été déterminée pour chaque modalité. Afin d'évaluer si les différences observées entre les modalités sont significatives, une analyse linéaire par modèle mixte de la variance (mixed-ANOVA) a été utilisée après transformation des données en  $\log(x+1)$  et vérification de l'homogénéité des variances (Test de Levene). Des comparaisons deux à deux des moyennes ont alors été réalisées (test de Student). Tous les tests ont été effectués à l'aide du logiciel (SAS Institute Inc., version 9.1, 2004).

### **Extraction des ARN à partir des jeunes plants de vigne**

Pour les analyses par microarrays, l'ARN a été extrait avec le kit commercial Spectrum (SIGMA) selon les recommandations du fournisseur. Les échantillons de racines ont été préalablement broyés en poudre fine dans de l'azote liquide avec un broyeur à bille TissueLyserII (Qiagen).

Pour chaque modalité, 400 mg de poudre de chacune des 3 boutures prélevées ont été pesés et regroupés en un « pool ». Ainsi 3 « pools » de 3 boutures correspondant aux 3 répétitions par modalité, ont été obtenus.

Les ARN ont ensuite été extraits à partir de 200 mg de chaque « pool ». Un traitement à la Dnase I (Invitrogen), afin d'éliminer les traces d'ADN, a été intégré au protocole selon les recommandations du fournisseur.

Les extraits d'ARN ont également été dosés au Nanodrop (ND-1000, ThermoScientific, Labtech Nanodrop) et leurs niveaux de qualité (pureté et état de dégradation) ont été contrôlés au Bioanalyser (Agilent).

### **Etape de purification des ARNs et validation de leur qualité**

Afin d'obtenir des ARN ayant une qualité optimale, une étape de précipitation avec lavage a été effectuée pour tous les échantillons. Cette étape diminue le rendement d'extraction mais augmente significativement la qualité des ARN extraits. Ainsi 0,1 Volume (V) d'acétate de sodium et 3 V d'éthanol absolu ont été ajoutés aux extraits d'ARN. Les tubes ont été placés à  $-20^{\circ}\text{C}$  pendant une nuit. Le lendemain, après une centrifugation de 30 minutes à 14 000 rpm, les surnageants ont été éliminés. Deux lavages avec 1 ml d'éthanol 70% à froid ont alors été effectués. Chaque lavage a été suivi d'une centrifugation pendant 5 minutes à 14 000 rpm en éliminant délicatement, à chaque fois, le surnageant. Après évaporation totale de l'éthanol, les ARN ont été resuspendus dans 20  $\mu\text{l}$  d'eau Nuclease Free et dosés au Nanodrop. La pureté des ARN 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 deux rapports doivent être supérieures à 1,8. Après ce premier niveau de contrôle, l'intégrité (mesure du niveau de dégradation des ARN) des ARN extraits a été mesurée au Bioanalyzer (Agilent).

### **Microarray : traitement des ADNc**

Les échantillons ont été traités au sein de la plateforme Get-Biopuces de Toulouse qui dispose de l'équipement nécessaire pour la réalisation des « expérimentations microarrays » (système d'hybridation Nimblegen, scanner de puces). Les ARN dont la qualité était :  $A260/A280 > 1,8$  ;  $A230/260 > 1,8$  ; RIN Bioanalyzer  $> 6$ , ont été traités selon les recommandations du fournisseur Nimblegen. Les ARN ont été rétro-transcrits comme indiqué ci-avant, marqués avec un fluorochrome, puis hybridés sur la lame microarray. Après hybridation et lavages, les lames ont été lues au scanner Nimblegen pour obtenir les images de fluorescence. La fluorescence associée à chaque sonde est déterminée par le logiciel associé au scanner et les fichiers de données ont été exportés pour analyse ultérieure. Les images obtenues ont également été exportées pour visualisation afin d'éliminer les données présentant un artefact. Une première étape de validation qualitative des données produites a été réalisée par le logiciel associé au scanner. Une seconde étape de validation a été effectuée lors de l'analyse statistique.

### **Microarray : analyse statistique**

Le logiciel associé au scanner Nimblegen a permis d'exporter les données sous plusieurs formats. Le format proposé par défaut, fichiers de type : .calls et .pairs, rend difficile l'utilisation des logiciels libres tels que R/Bioconductor (Gentleman *et al.* 2004) pour l'analyse statistique des données Nimblegen. Ce format est en effet plutôt adapté aux logiciels propriétaires. Le format de type .xys permet l'utilisation des logiciels libres.

Les fichiers de données (.xys) ont été utilisés et importés dans le logiciel de statistiques R/Bioconductor et les traitements successifs ont permis la validation qualitative des données par le package ArrayQualityMetrics (Kauffmann *et al.* 2009) et la normalisation des données par le package Affy (méthode de normalisation RMA, Gautier *et al.* 2004 ; Irizarry *et al.* 2003). Les données normalisées ont ensuite été exportées sous un format "ExpressionSet" pour analyse statistique par un logiciel utilisant R/Bioconductor avec une interface fenêtrée : TMEV (Saeed *et al.* 2003).

Les analyses statistiques ont finalement permis d'extraire des données, les gènes différentiellement exprimés entre les modalités étudiées. Différentes méthodes statistiques

ont été testées pour retenir au final l'analyse Limma (Linear Method for Microarrays Analysis, Smyth 2005) avec un seuil de probabilité (p-value) de 0,01. Ce type d'analyse permet également d'obtenir une valeur de différence (Fold Change (FC) ou niveau d'expression) entre les modalités comparées. Il a été choisi afin de comparer les modalités à 2 temps : 7 et 21 jours après introduction de *P. oligandrum* au niveau du système racinaire des boutures de vigne, ce qui nous a procuré une liste de gènes dont l'expression avait évolué dans le temps. Ces listes de gènes ont alors fait l'objet d'une analyse biologique/bioinformatique.

### **Microarray : analyse biologique**

Les listes de gènes différenciellement exprimés, e.g. jeunes plants témoins et ceux inoculés par *P. oligandrum*, ont été comparées par diagramme de Venn (<http://genevenn.sourceforge.net>). Ces listes ont été utilisées pour analyse/visualisation dans l'outil Mapman (Thimm *et al.* 2004) qui permet de déterminer les catégories fonctionnelles des gènes concernés et également d'extraire les catégories fonctionnelles statistiquement significatives du fait du traitement (environnement pour les modalités témoins, interaction plante/micro-organisme pour les modalités traitées).

### **Microarray : validation de l'expression des gènes par RT-qPCR**

Quelques gènes issus des analyses statistiques et biologiques des microarrays ont fait l'objet d'analyse par RT-qPCR afin de confirmer la tendance à la sur- ou sous-expression observée chez les plants inoculés par *P. oligandrum* par rapport à ceux témoin.

Les ARN extraits à partir de poudres broyées dans l'azote liquide (cf « pools » des modalités) ont été testés pour leur qualité (Nanodrop), rétro-transcrits et utilisés dans des expériences de RT-qPCR avec des amorces spécifiques conçues à l'aide de l'outil Primer-blast du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>). La liste des amorces utilisées est fournie dans le tableau 2a.

Les transcriptions réverses ont été réalisées à l'aide de l'enzyme reverse transcriptase M-MLV (Invitrogen<sup>TM</sup>, Life technologies, France) suivant les recommandations du fournisseur. Brièvement, 0,5 µg d'ARN totaux ont été rétro-transcrits en ADNc en utilisant, pour chaque échantillon, 1 µl d'oligo d(T)<sub>12-18</sub> (500 µg.ml<sup>-1</sup>) et 1 µl de dNTP.

Le protocole de qPCR suit les recommandations du fournisseur du kit MESA BLUE qPCR for SYBR<sup>®</sup> (Eurogentec, Belgique). Une courbe de dissociation a été effectuée pour chaque gène utilisé afin de s'assurer de la spécificité des amorces. Les expériences de qPCR ont été effectuées avec l'appareil Stratagène MX3005P (Agilent technologies, France, Ivry sur

Seine) en utilisant la technologie Sybr-green. Les résultats de RT-qPCR (courbes brutes de fluorescence) ont été exportées à partir du logiciel (MX 3005 de Stratagene) et analysées par l'utilitaire LinRegPCR (Ruijter *et al.* 2009) qui permet de déterminer la ligne de base pour chaque échantillon et de calculer les valeurs de quantité relative N0 (unité de fluorescence), de la cible (ARNm du gène considéré) au sein de l'échantillon. Ces valeurs ont été comparées à celles de trois gènes de référence (tableau 2b). Les valeurs obtenues sont enfin utilisées pour calculer la différence d'expression entre modalités, *i.e.* le FC.

Tableau 2a Amorces utilisées pour la validation qPCR des données micro-arrays.

Identifiants du gène*	Fonction	Catégorie fonctionnelle Mapman	Sens (5'>3')	Anti-sens (3'>5')
V0 - 12X V1 - 12X chr4_jgvv23_18_t01 Vv04s0023g03750	Ascorbate Peroxidase	21.2.1 redox.ascorbate and glutathione.ascorbate	AAGAAGGG CTCCTCCC AGAT	ACTTGCTTAT GTGCCCCTCC
chr1_jgvv11_153_t01 Vv01s0011g05100	proteine Major Latex Like (MLL)	20.1.7 stress.biotic.PR-proteins	GTTCCACG AGGTCTGT AGCC	AGTCCAAAGC TGGACAGAGC
chr4_jgvv23_156_t01 Vv04s0023g02240	salicylic acid carboxyl methyltransferase	17.8.1 hormone metabolism.salicylic acid.synthesis-degradation	TGCTGATC GCATGACC AGAG	GTTGGATGAA GCAGCTTGCC
chr14_jgvv83_11_t01 Vv14s0083g00110	Jasmonate Allene Oxidase	17.7.1.4 hormone metabolism.jasmonate.synthesis-degradation.allene oxidase cyclase	GGCATCAT GGTCCTCT CACA	GAAGTTCCTG AGAGCAGGG G
chr14_jgvv108_70_t01 Vv14s0108g00740	Gibberelin Induced Protein	17.6.3 hormone metabolism.gibberelin.induced-regulated-responsive-activated	GTTCGAAG CATTGGAT CGCC	TTTGGTCGTA GTGGTGACCG
chr1_jgvv11_360_t01 Vv01s0011g02960	Leucoanthocyanidin reductase 1	16.8.5.1 secondary metabolism.flavonoids.isoflavonols.leucoanthocyanidin reductase	CTATTGAT GGCCCGG AGGAC	AGGACCGGT GTTGGCAATA G
chr8_jgvv7_205_t01 Vv08s0007g06860	Terpenoid Synthase 1	16.1.5 secondary metabolism.isoprenoids.terpenoids	TCTGCAAT GGAACTAA CCCTCA	ATCGCCTTTC GGTCACTTGT
chr2_jgvv25_429_t01 Vv02s0025g04720	Leucoanthocyanidine dioxygénase	16.8.1.1 secondary metabolism.flavonoids.anthocyanins.leucocyanidin oxygenase	TGGTGGGA TGGAAGAG CTAC	CCCACCTTGCC CTCATAGAAA
chr14_jgvv68_88_t01 Vv14s0068g00930	Chalcone synthase	16.8.2.1 secondary metabolism.flavonoids.chalcones.naringenin-chalcone synthase	CCAACAAT GGTGTCAG TTGC	CTCGGTCATG TGCTCACTGT

Le séquençage du génome de la vigne a produit successivement une version 8X (représentant une quantité de séquences de 8 fois la taille du génome) puis 12X (V0 puis V1) et enfin 12X (V1new). Les identifiants cités ici correspondent à ceux fournis par l'annotation 12X V0 (chr...) et les équivalents 12X V1 (Vv...) ou 12X V1new (VIT...). Le premier nombre dans chaque cas correspond au numéro du chromosome. Les identifiants 12X V1new sont de la forme "VIT...". Les séquences utilisées pour le design de la puce Nimblegen sont celles issues de l'annotation 12X V0 soit les identifiants de la forme "chr....".

Tableau 2b Gènes de référence (niveau d'expression identique dans les différentes conditions).

Identifiants du gène* V0 - 12X V1 - 12X	Fonction	Catégorie fonctionnelle Mapman	Sens (5'>3')	Anti-sens (3'>5')
chr17_jgvv0_5_t01 Vv17s0000g10430	Glyceralde hyde-3- phosphate dehydroge nase	4.9 glycolysis.glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GCGTTCG CCCAGAT CGTGAT	AGGCCGAGA AGGGTGACC GG
chr5_jgvv20_398_t01 Vv05s0020g04250	Mitosis protein dim1	35.1 not assigned.no ontology	ACCTTCA CTCTGGA TGGGCCG T	CCCAATCGT GGCCGAACC GA
chr6_jgvv4_524_t01 Vv06s0004g02820	Sand protein	35.1 not assigned.no ontology	CGGGGTC GCAAACG GATCGT	GCCCCGTTC CCCAGCATA GC

\* Le séquençage du génome de la vigne a produit successivement une version 8X (représentant une quantité de séquences de 8 fois la taille du génome) puis 12X (V0 puis V1) et enfin 12X (V1new). Les identifiants cités ici correspondent à ceux fournis par l'annotation 12X V0 (chr...) et les équivalents 12X V1 (Vv...) ou 12X V1new (VIT...). Le premier nombre dans chaque cas correspond au numéro du chromosome. Les identifiants 12X V1new sont de la forme "VIT..". Les séquences utilisées pour le design de la puce Nimblegen sont celles issues de l'annotation 12X V0 soit les identifiants de la forme "chr....".

## Résultats

### 1. Evaluation de la colonisation racinaire de jeunes plants de vigne par *P. oligandrum*

Afin d'évaluer la capacité d'implantation et de persistance de *P. oligandrum* dans la rhizosphère, des prélèvements de racines ont été régulièrement réalisés (tableau 3). Une analyse de variance (ANOVA) a permis de vérifier qu'il n'y avait pas d'effet bloc associé au dispositif expérimental. Avant inoculation par l'oomycète (jour 0), *P. oligandrum* n'était pas présent au niveau des racines des boutures de Cabernet Sauvignon. La première année d'expérimentation, en 2010, le plus fort taux de colonisation était observé 7 jours après inoculation pour l'inoculum n°2, avec 67% des fragments racinaires qui étaient colonisés, et 21-35 jours après inoculation pour l'inoculum n°1 (respectivement 38,3 et 38,9%). Les souches de l'inoculum n°2 sont significativement plus fréquemment détectées que celles du n°1 aux temps 7, 21 et 35 jours. Pour les 2 traitements, 4 mois après inoculation (ou 121 jours), les niveaux de colonisation par *P. oligandrum* pour les deux traitements ne sont pas significativement différents. Lors de la deuxième année d'expérimentation, en 2011, les plus forts taux de colonisation des racines pour les deux inocula étaient observés 7 jours après inoculation par l'oomycète, *i.e.* 66% pour l'inoculum n°2 et 37% pour le n°1. Les souches de ce dernier sont significativement moins isolées à 21, 35 et 63 jours, ainsi qu'à la fin de l'expérimentation (121 jours), en comparaison à celles du n°2. Globalement, (tableau 4) l'inoculum n°2 présente, en moyenne, un taux de colonisation (31,7% et 35,5% respectivement en 2010 et 2011) plus important que le n°1 (13,4 et 18,9% respectivement en 2010 et 2011) durant la période d'expérimentation, soit 4 mois.

Tableau 3 Evaluation par méthode culturale du pourcentage de colonisation racinaire par *P. oligandrum* en 2010 et 2011. Les valeurs correspondent aux moyennes (en %)  $\pm$  erreur standard, de 9 plants échantillonnés par temps de prélèvement (20 racines par plant). Les moyennes avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes selon le test statistique de Student à  $p < 0,05$  (ANOVA modèle mixte).

Traitement (jours post inoculation)	Colonisation racinaire	
	2010	2011
0		
Inoculum 1	0 $\pm$ 0 f	0 $\pm$ 0 d
Inoculum 2	0 $\pm$ 0 f	0 $\pm$ 0 d
Témoin	0 $\pm$ 0 f	0 $\pm$ 0 d
7		
Inoculum 1	11,7 $\pm$ 5,3 de	36,7 $\pm$ 6,3 ab
Inoculum 2	62,2 $\pm$ 10,1 a	65,6 $\pm$ 10,6 a
Témoin	0,60 $\pm$ 0,6 f	0 $\pm$ 0 d
21		
Inoculum 1	26,7 $\pm$ 9,1 bcd	16,67 $\pm$ 6,7 c
Inoculum 2	38,3 $\pm$ 8,3 ab	52,8 $\pm$ 11,5 ab
Témoin	0,60 $\pm$ 0 f	0 $\pm$ 0 d
35		
Inoculum 1	13,3 $\pm$ 4,2 cde	9,4 $\pm$ 5,9 c
Inoculum 2	38,9 $\pm$ 9,2 ab	32,2 $\pm$ 9,1 b
Témoin	0 $\pm$ 0 f	0 $\pm$ 0 d
63		
Inoculum 1	7,2 $\pm$ 3,3 cde	11,1 $\pm$ 3,7 c
Inoculum 2	28,3 $\pm$ 9,4 bc	25,6 $\pm$ 6,1 b
Témoin	0 $\pm$ 0 f	0 $\pm$ 0 d
121		
Inoculum 1	8,3 $\pm$ 3,9 e	20,6 $\pm$ 9,4 c
Inoculum 2	22,8 $\pm$ 9,1 e	36,7 $\pm$ 7,9 ab
Témoin	0 $\pm$ 0 f	0 $\pm$ 0 d

Tableau 4 Evaluation du pourcentage de colonisation racinaire par *P. oligandrum* en 2010 et 2011 durant la période de 4 mois. Les valeurs reportées sont les moyennes (en %)  $\pm$  erreur standard, de 45 plants échantillonnés (20 racines par plant) Les moyennes avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes selon le test statistique de Student à  $p < 0,05$  (mixed ANOVA modèle mixte).

Traitement	Colonisation racinaire	
	2010	2011
Inoculum 1	13,4 $\pm$ 4,2 b	18,9 $\pm$ 3,2 b
Inoculum 2	38,1 $\pm$ 2,3 a	42,6 $\pm$ 4,5 a
Témoin	0,2 $\pm$ 0,2 c	0 $\pm$ 0 c

## 2. Analyses des réponses de la plante par microarrays

Les modifications transcriptionnelles chez *Vitis vinifera* en réponse au traitement par *P. oligandrum* au niveau des racines ont été étudiées par analyse microarrays. En 2010 les plus forts taux de colonisation racinaire par *P. oligandrum* ayant été observés 7 et 21 jours après inoculation par l'inoculum n°2 (voir paragraphe précédent), les échantillons de racines correspondant à ces deux temps ont été prélevés et utilisés pour la présente étude transcriptomique.

Dans cette partie de présentation des résultats, une description globale des gènes différentiellement exprimés au cours du temps (7 et 21 jours) est d'abord présentée, puis une description des catégories fonctionnelles significativement modifiées est réalisée. Une analyse fine du niveau de régulation des différents transcrits, ceci pour les gènes les plus significativement exprimés, est également décrite.

### 2.1 Les changements globaux induit par *P. oligandrum*

Selon les modalités, la comparaison du niveau d'expression des gènes des racines montre que parmi les 29549 gènes de la vigne présents sur la puce microarray Nimblegen, 1916 présentent un changement significatif au niveau de leur expression dans la modalité « racines colonisées par *P. oligandrum* », contre seulement 412 gènes pour les plants témoins. Le diagramme de Venn de la figure 2 permet la détermination des gènes spécifiques et communs à chacune des 2 modalités. Peu de gènes sont différentiellement exprimés chez les plants témoins, 102 gènes, en comparaison aux 1604 gènes des plants traités par *P. oligandrum*. Certains gènes communs aux 2 traitements évoluent significativement au cours du temps (312 gènes).

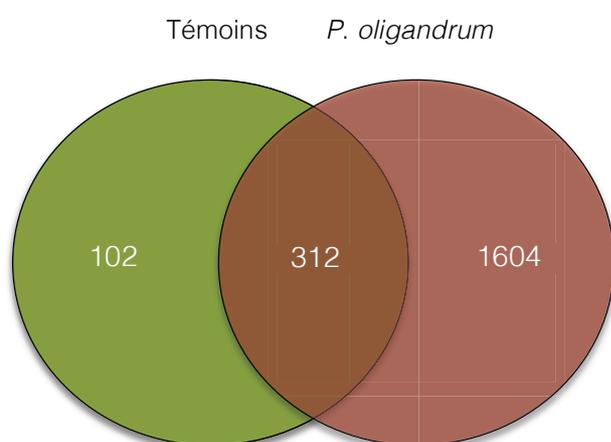


Figure 2 Diagramme de Venn représentant les gènes différentiellement exprimés au cours du temps selon le traitement ( $p < 0,01$  Limma) (entre 7 et 21 jours post- inoculation par *P. oligandrum*, plants témoin).

## 2.2 Analyse de l'ontologie des gènes dont l'expression est significativement modifiée

L'ontologie des gènes correspond à la description structurée via une annotation commune des fonctions et des propriétés des gènes et des produits géniques. Cette ontologie couvre trois domaines: (1) les composants cellulaires, *i.e.* dans le milieu intracellulaire ou dans l'environnement extracellulaire ; (2) les fonctions moléculaires, *i.e.* les activités élémentaires d'un produit de gène au niveau moléculaire tel que les phénomènes de catalyses ou de fixation (binding) ; (3) les processus biologiques, *i.e.* les opérations ou séries d'événements moléculaires avec un début et une fin, pertinents pour le fonctionnement des unités de vie intégrés que sont les cellules, les tissus, les organes et les organismes (<http://www.geneontology.org>). Ainsi, l'analyse de l'ontologie des gènes via le logiciel Agrigo (version 1.2) permet de montrer quels processus biologiques, composants cellulaires et fonctions moléculaires sont les plus significativement modifiés au cours du temps. Pour les 1604 gènes spécifiquement exprimés lors de l'interaction *V. vinifera* / *P. oligandrum*, 1109 d'entre eux sont annotés sur la base de données « gène ontologie » et ont pu être comparés aux 18 724 gènes possédant une annotation établie et reconnue par la communauté scientifique (tableau 5). Au cours du temps (7 et 21 jours), 4 ontologies sont significativement modifiées lors de l'interaction, ce sont les gènes impliqués dans la réponse aux stimuli, l'activité de transduction de signal, l'activité de récepteurs et la région extracellulaire. Chez les plants témoins, l'évolution au cours du temps est différente, seul les gènes impliqués dans les composantes cellulaires sont significativement affectés.

Tableau 5 Ontologies significativement exprimées (induites ou réprimées) chez les plants traités avec *P. oligandrum* et chez les plants témoins au cours du temps (7 et 21 jours).

Ontologie	Description	Nombre de gènes significativement exprimés	Nombre de gènes sur la puce	p-value
<i>Traitement P. oligandrum</i>				
Processus biologique	response to stimulus	301	3959	$5,50 \times 10^{-5}$
Fonction cellulaire	signal transducer activity	113	1377	$5,90 \times 10^{-4}$
Fonction cellulaire	molecular transducer activity	113	1377	$5,90 \times 10^{-4}$
Fonction cellulaire	receptor activity	103	1226	$4,50 \times 10^{-4}$
Composants cellulaires	extracellular region	122	1245	$1,70 \times 10^{-7}$
<i>Témoin</i>				
Composants cellulaires	chromosome	18	277	$1,30 \times 10^{-6}$
Composants cellulaires	intracellular non-membrane-bounded organelle	18	277	$1,30 \times 10^{-6}$
Composants cellulaires	non-membrane-bounded organelle	18	277	$1,30 \times 10^{-6}$
Composants cellulaires	extracellular region	40	1245	$1,10 \times 10^{-4}$
Composants cellulaires	extracellular space	15	292	$1,30 \times 10^{-4}$
Composants cellulaires	extracellular region part	15	308	$2,40 \times 10^{-4}$

### 2.3 Catégories fonctionnelles de gènes différentiellement exprimés

Les gènes différentiellement exprimés peuvent être classés en catégories fonctionnelles à l'aide du logiciel Mapman (version 10). Les tableaux 6 et 7 présentent celles qui ont été significativement modifiées au cours du temps, respectivement pour les 1604 gènes spécifiques aux plants traités par *P. oligandrum*, et pour les 102 des plants témoins.

Cinq catégories fonctionnelles sont significativement différentiellement exprimées au cours du temps chez les plants témoins (tableau 6). Quatre d'entre elles : la division cellulaire (Bin 31), la voie des terpenoïdes (impliquée dans le métabolisme secondaire) (Bin 16), la voie de l'acide salicylique (impliquée dans le métabolisme hormonal) (Bin 17), et le développement de protéines de stockage (Bin 33) sont surexprimées. La catégorie fonctionnelle, « metal handling » (Bin 15), est par contre réprimée. Globalement, 18 gènes sont surexprimés et 2 sont réprimés.

Tableau 6 Catégories fonctionnelles différentiellement exprimées (différences statistiquement significatives selon le test des rangs de Wilcoxon, (à  $p < 0,01$ ) au cours du temps (7 et 21 jours) chez les plants témoins. Les résultats sont extraits des catégories fonctionnelles du logiciel MapMan montrant le nombre de gènes annotés pour chaque processus ou familles de protéines. Le terme « Bin » indique le numéro de catégorie fonctionnelle utilisé par Mapman.

Bin	Catégorie fonctionnelle	Nombre de gènes sous / sur-exprimés	p-value
15	metal handling		
15.2	metal handling.binding, chelation and storage	2/0	$2,05 \times 10^{-2}$
16	secondary metabolism		
16.1	secondary metabolism.isoprenoids		
16.1.5	secondary metabolism.isoprenoids.terpenoids	0/7	$5,55 \times 10^{-3}$
17.8	hormone metabolism.salicylic acid		
17.8.1	hormone metabolism.salicylic acid.synthesis-degradation	0/5	$8,16 \times 10^{-3}$
31	cell		
31.2	cell.division	0/4	$9,93 \times 10^{-3}$
33	development		
33.1	development.storage proteins	0/2	$3,98 \times 10^{-2}$

Pour les plants dont les racines sont colonisées par *P. oligandrum*, 7 catégories et sous-catégories fonctionnelles sont significativement différentiellement exprimées (tableau 7). Il s'agit des gènes codant pour des transcrits impliqués dans la signalisation et les récepteurs de stress biotiques (Bin 20), le métabolisme secondaire (Bin 16), le statut redox (Bin 21), le métabolisme des hormones (Bin 17), la régulation des ARN (Bin 27.3) et les protéines de dégradation de type subtilases (Bin 29.5.1).

Tableau 7 Catégories fonctionnelles différenciellement exprimés au cours du temps pour les 1604 gènes spécifiques de l'interaction *V. vinifera* / *P. oligandrum* et statistiquement significativement exprimés selon le test des rangs de Wilcoxon (à  $p < 0,05$ ) Les résultats sont extraits de l'ontologie génétique de MapMan montrant le nombre de gènes annotés pour chaque processus ou familles de protéines.

Bin	Catégorie fonctionnelle	Nombre de gènes sous /sur-exprimés	p-value
20	Stress		
20.1.2	Stress.biotic.receptors	3/52	$3,18 \times 10^{-7}$
20.1.3	Stress.biotic.signaling	0/7	$3,99 \times 10^{-2}$
16	Secondary metabolism		
16.1.5	Secondary metabolism.isoprenoids.terpenoids	0/11	$4,06 \times 10^{-4}$
16.8	Secondary metabolism.flavonoids		
16.8.1.21	Secondary metabolism.flavonoids.anthocyanins.anthocyanin 5-aromatic acyltransferase	2/0	$1,54 \times 10^{-2}$
16.8.2	Secondary metabolism.flavonoids.chalcones		
16.8.2.1	Secondary metabolism.flavonoids.chalcones.naringenin-chalcone synthase	0/7	$4,82 \times 10^{-4}$
21	Redox		
21.1	Redox.thioredoxin	4/1	$3,99 \times 10^{-2}$
21.3	Redox.heme	3/0	$4,78 \times 10^{-3}$
17	Hormone metabolism		
17.1.3	Hormone metabolism.abscisic acid.induced-regulated-responsive-activated	0/9	$7,60 \times 10^{-3}$
27.3.1	RNA.regulation of transcription.ABI3_VP1-related B3-domain-containing transcription factor family	2/0	$4,14 \times 10^{-2}$
27.3.3	RNA.regulation of transcription.AP2/ERF_Ethylene-responsive element binding protein family	3/18	$2,36 \times 10^{-3}$
27.3.6	RNA.regulation of transcription.bHLH,Basic Helix-Loop-Helix family	0/8	$2,51 \times 10^{-2}$
27.3.11	RNA.regulation of transcription.C2H2 zinc finger family	3/2	$4,29 \times 10^{-2}$
27.3.20	RNA.regulation of transcription.G2-like transcription factor family, GARP	4/0	$1,78 \times 10^{-2}$
27.3.26	RNA.regulation of transcription.MYB-related transcription factor family	2/1	$2,17 \times 10^{-2}$
29.5.1	Protein.degradation.subtilases	0/9	$1,97 \times 10^{-2}$

Les catégories fonctionnelles du métabolisme secondaire significativement modifiées sont celles des anthocyanes et les chalcones impliquées dans la voie des flavonoïdes et les terpenoïdes de la famille des isoprenoïdes. Seule la catégorie, acide abscissique, du métabolisme des hormones est significativement modifiée avec une probabilité de  $7,60 \times 10^{-3}$  et caractérisée par une induction des gènes. Plus globalement, la régulation des gènes dans les différentes catégories fonctionnelles tend majoritairement vers l'induction. En effet, 138 gènes sont surexprimés contre 26 qui sont réprimés. Toutefois, certaines catégories sont uniquement réprimées, *i.e.* la redox.heme et les gènes des anthocyanines, ainsi que quelques gènes de la régulation de la transcription des ARN. Les hémoprotéines sont aussi réprimées, alors qu'elles sont omniprésentes en biologie et sont couramment impliquées dans des processus critiques tels que le transfert d'électrons, la phosphorylation oxydative et la transduction du signal.

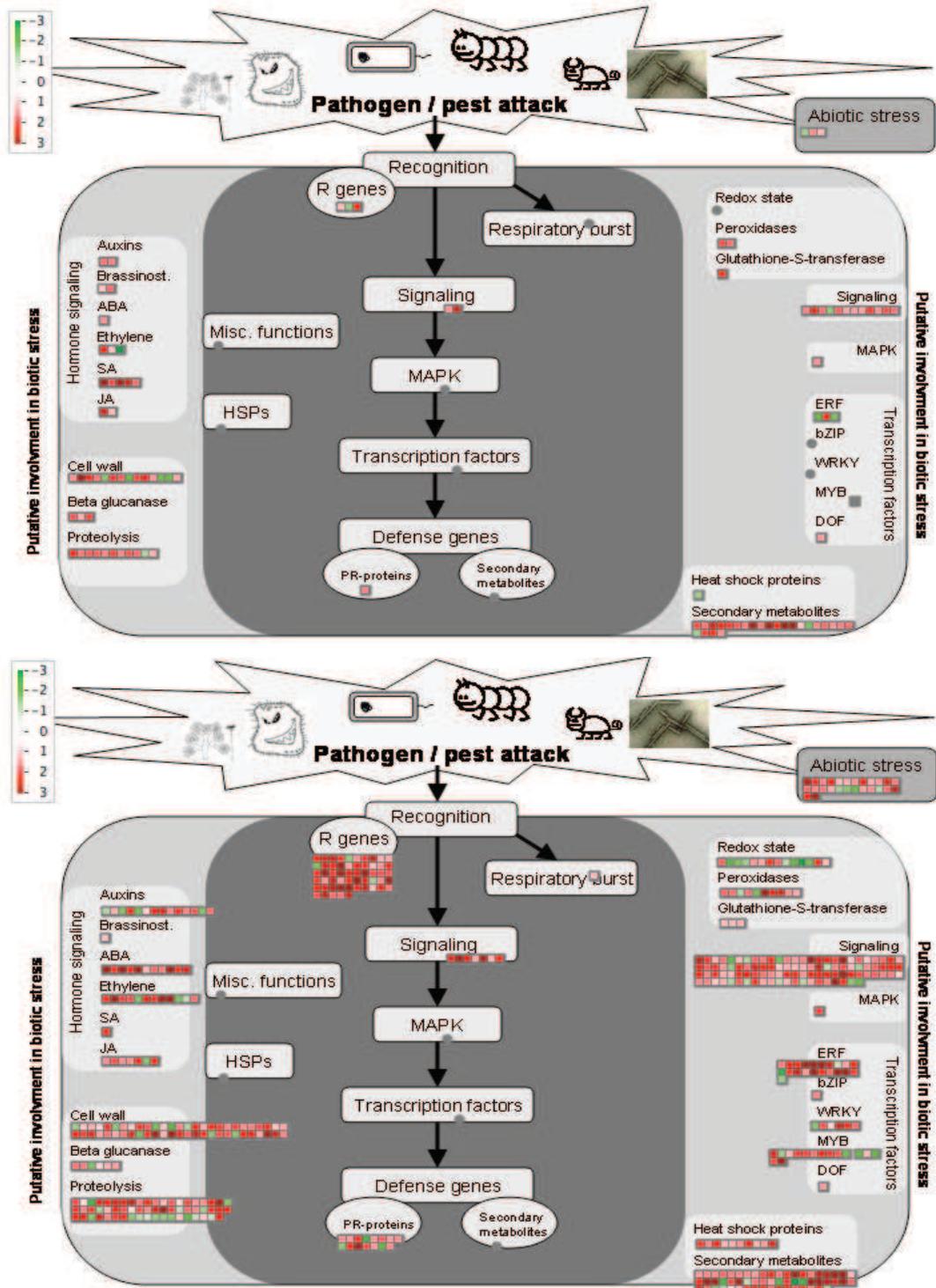


Figure 3 Visualisation par Mapman des gènes assignés aux catégories fonctionnelles du stress biotique et différemment exprimés au cours du temps (7 et 21 jours) pour les plants traités avec *P. oligandrum* (en bas) et les témoins (en haut). Chaque carré représente un gène. Plus ce gène est fortement induit plus il est rouge foncé. A l'inverse plus il est réprimé plus il est vert foncé.

## 2.4 Modifications des gènes associés à un stress biotique

La figure 3 issue des analyses Mapman, présente les gènes significativement surexprimés (en rouge) et réprimés (en vert), au cours du temps pour les plants colonisés par *P. oligandrum* et ceux témoins pour les familles de gènes impliquées dans un stress biotique. Globalement, un grand nombre de gènes est surexprimé en comparaison aux plants témoins. Les catégories fonctionnelles significatives dans l'interaction entre les racines de vigne et *P. oligandrum*, présentées précédemment, sont retrouvées dans le groupe des gènes de résistances (appelés « Rgenes »), dans la signalisation, les facteurs de transcription, le métabolisme des hormones, le métabolisme secondaire, et dans la protéolyse.

Les gènes les plus significativement exprimés et appartenant aux catégories fonctionnelles précédemment présentées comme étant significativement modifiées dans leurs expressions (tableau 7), sont décrits ci-après pour les plants traités par *P. oligandrum*.

## 2.5 Surexpression des Rgènes

La catégorie des gènes associés à la résistance, les « Rgènes » est indiquée dans le tableau 8, leur expression est statistiquement significativement modifiée. Chez les plants colonisés par *P. oligandrum*, tous ces gènes sont surexprimés, un seul codant pour une « Disease resistance-like protein » est réprimé, son niveau de répression est de -1,38. A l'inverse le gène le plus exprimé est similaire à une « resistance protein » avec un niveau de 3,90. Vingt quatre gènes ont des niveaux d'expression supérieurs à 2. Parmi les plus abondants, 5 transcrits sont similaires au gène « Resistance gene analog NBS9 », 6 transcrits correspondent au gène « resistance protein » et 4 transcrits au gène « Disease resistance proteine-like protein MsR1 ». Trois gènes codant pour des récepteurs kinases, « CLV1-like LRR receptor kinase » et un gène codant pour un récepteur de type NBS-LRR sont également induits.

Tableau 8 Principaux gènes de résistance (Rgenes) différentiellement exprimés au cours du temps (de 7 à 21 jours) pour les plants traités avec *P. oligandrum*. Niveaux d'expression exprimés en log 2, l'expression des gènes est significativement différente selon le test statistique Limma à  $p < 0,01$  avec un niveau d'expression  $> 1,5$  ou  $< -1,5$ .

Gène	Description Mapman	Niveau d'expression
chrn_jgvv275_4_t01	resistance protein [ <i>Vitis vinifera</i> ]	3,9
chr5_jgvv29_47_t01	resistance protein [ <i>Vitis vinifera</i> ]	2,81
chrn_jgvv160_28_t01	resistance protein [ <i>Vitis vinifera</i> ]	2,73
chr18_jgvv41_189_t01	resistance protein [ <i>Vitis vinifera</i> ]	2,23
chr12_jgvv34_134_t01	resistance protein [ <i>Vitis vinifera</i> ]	2,19
chr18_jgvv72_6_t01	resistance protein [ <i>Vitis vinifera</i> ]	1,74
chr1_jgvv11_529_t01	resistance gene analog [ <i>Vitis vinifera</i> ]	2,54
chr1_jgvv146_30_t01	Leucine-rich repeat protein	2,16
chrn_jgvv160_7_t01	CLV1-like LRR receptor kinase { <i>Oryza sativa</i> }	2,75
chr18_jgvv41_76_t01	CLV1-like LRR receptor kinase { <i>Oryza sativa</i> }	2,59
chr12_jgvv34_171_t01	CLV1-like LRR receptor kinase { <i>Oryza sativa</i> }	2,29
chrn_jgvv335_1_t01	resistance gene analog NBS9 { <i>Helianthus annuus</i> }	3,19
chrn_jgvv160_32_t01	resistance gene analog NBS9 { <i>Helianthus annuus</i> }	2,8
chrn_jgvv184_11_t01	resistance gene analog NBS9 { <i>Helianthus annuus</i> }	2,75
chr18_jgvv41_86_t01	resistance gene analog NBS9 { <i>Helianthus annuus</i> }	2,66
chrn_jgvv160_27_t01	resistance gene analog NBS9 { <i>Helianthus annuus</i> }	2,58
chr13_gsvivt00032161001_t01	resistance gene analog [ <i>Vitis vinifera</i> ]	2,85
chr18_random_jgvv82_109_t01	NBS-type resistance protein { <i>Gossypium barbadense</i> }	1,99
chr7_jgvv197_9_t01	Disease resistance-like protein { <i>Arabidopsis thaliana</i> }	2,36
chr7_jgvv197_20_t01	Disease resistance-like protein { <i>Arabidopsis thaliana</i> }	1,57
chr8_jgvv7_193_t01	Disease resistance-responsive family protein	2,14
chr18_random_jgvv82_111_t01	Nematode resistance protein	3,27
chrn_jgvv288_2_t01	Nematode resistance protein	3,16
chr18_random_jgvv170_16_t01	Nematode resistance protein	1,92
chrn_jgvv487_5_t01	Disease resistance protein-like protein MsR1	3,5
chr7_gsvivt00003560001_t01	Disease resistance protein-like protein MsR1	1,98
chr18_jgvv41_3_t01	NBS-LRR type disease resistance protein	1,93
chr18_random_jgvv82_110_t01	Resistance gene analog NBS2 { <i>Helianthus annuus</i> }	3,75
chr18_random_jgvv82_112_t01	Resistance gene analog NBS2 { <i>Helianthus annuus</i> }	2,65
chrn_jgvv288_6_t01	Disease resistance-like protein { <i>Arabidopsis thaliana</i> }	2,74
chr18_jgvv117_42_t01	Disease resistance-like protein { <i>Arabidopsis thaliana</i> }	-1,85

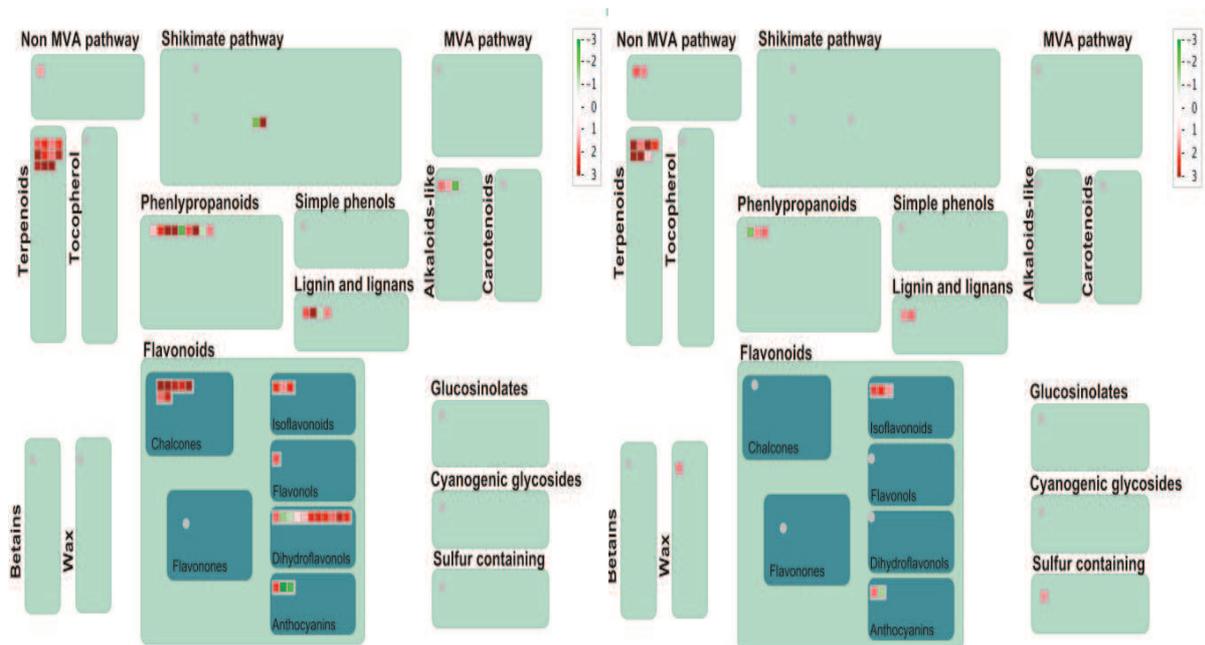


Figure 4 Visualisation par Mapman des gènes assignés au métabolisme secondaire différemment exprimés au cours du temps (7 et 21 jours) chez les plants traités avec *P. oligandrum* (à gauche) et les témoins (à droite). Chaque carré représente un gène. Plus un gène est fortement induit plus il est rouge foncé. A l'inverse plus il est réprimé plus il est vert foncé.

## 2.6 Surexpression des gènes du métabolisme secondaire

Les gènes impliqués dans le métabolisme secondaire sont exprimés de façon très différentes chez les plants témoins et ceux traités par *P. oligandrum* (figure 4). Ce dernier induit une surexpression de gènes de la famille des terpenoïdes et flavonoïdes via les voies des chalcones et des anthocyanes. L'expression de ces 2 dernières familles a été trouvée statistiquement significativement modifiée précédemment lorsque les catégories fonctionnelles ont été considérées (tableau 7) ; le tableau 9 ci-après, présente les différents transcrits identifiés selon l'annotation Mapman.

Les gènes montrent une surexpression allant de 1,67 à 4,99. Un gène est réprimé, il code pour une protéine similaire au Malonyl-CoA. Le gène le plus fortement induit code pour une enzyme, la terpène synthase, dont le niveau d'expression est proche de 5. Cinq autres transcrits sont similaires à cette terpène synthase. Une autre protéine, la chalcone synthase, est aussi représentée de manière importante, puisque 7 transcrits sont mis en évidence avec des niveaux d'expression proches en moyenne de 3.

Tableau 9 Principaux gènes du métabolisme secondaire différenciellement exprimés au cours du temps (de 7 à 21 jours) pour les plants traités avec *P. oligandrum*. Niveaux d'expression exprimés en log 2, l'expression des gènes est significativement différente selon le test statistique Limma à  $p < 0,01$  avec un niveau d'expression  $> 1,5$  ou  $< -1,5$ .

Gène	Description	Niveau expression
chr19_jgvv14_435_t01	Terpene synthase [Vitis vinifera]	4,99
chr19_jgvv14_433_t01	Terpene synthase [Vitis vinifera]	3,11
chr19_jgvv14_436_t01	Terpene synthase [Vitis vinifera]	2,46
chr19_jgvv14_429_t01	Terpene synthase [Vitis vinifera]	2
chr19_jgvv14_88_t01	Terpene synthase [Vitis vinifera]	1,73
chr19_pdvv15_168_t01	Terpene synthase [Vitis vinifera]	1,67
chr9_gsvivt00029485001_t01	Cycloartenol Synthase {Panax ginseng}	2,83
chr16_jgvv22_118_t01	Chalcone synthase [Vitis vinifera]	3,38
chr16_pdvv22_134_t01	Chalcone synthase [Vitis vinifera]	3,23
chr16_pdvv22_118_t01	Chalcone synthase [Vitis vinifera]	2,82
chr14_jgvv68_87_t01	Chalcone synthase [Vitis vinifera]	2,66
chr16_jgvv22_128_t01	Chalcone synthase [Vitis vinifera]	1,83
chr14_jgvv68_88_t01	Chalcone synthase [Vitis vinifera]	3,19
chr16_jgvv271_5_t01	Terpenoid synthase [Vitis vinifera]	3,51
chr16_jgvv271_3_t01	Terpenoid synthase [Vitis vinifera]	2,85
chr13_random_jgvv112_10_t01	Terpenoid synthase [Vitis vinifera]	2,25
chr5_jgvv136_15_t01	Chalcone synthase [Vitis vinifera]	2,62
chr12_jgvv134_51_t01	Malonyl CoA:anthocyanin 3-O-glucoside-6-O-malonyltransferase	-2,62

Les gènes montrent une surexpression allant de 1,67 à 4,99. Un gène est réprimé, il code pour une protéine similaire au Malonyl-CoA. Le gène le plus fortement induit code pour une enzyme, la terpène synthase, dont le niveau d'expression est proche de 5. Cinq autres transcrits sont similaires à cette terpène synthase. Une autre protéine, la chalcone synthase, est aussi représentée de manière importante, puisque 7 transcrits sont mis en évidence avec des niveaux d'expression proches en moyenne de 3.

## 2.7 Surexpression des gènes du métabolisme des hormones

Le métabolisme hormonal significativement modifié est celui de l'acide abscissique (tableau 7). Le traitement avec *P. oligandrum* est associé à une surexpression des transcrits au cours du temps, 6 d'entre eux étant supérieurs à 2 (tableau 10). Les transcrits qui codent pour un gène similaire à l'AtHVA22a sont les plus nombreux, ils représentent 6 des 9 gènes statistiquement significativement exprimés dans la catégorie.

Tableau 10 Principaux gènes du métabolisme hormonal de l'acide abscissique différemment exprimés au cours du temps (de 7 à 21 jours) pour les plants traités avec *P. oligandrum*. Niveaux d'expression exprimés en log 2, l'expression des gènes est significativement différente selon le test statistique Limma à  $p < 0,01$ .

Gène	Description	Niveau expression
chr3_jgvv132_8_t01	AtHVA22a { <i>Oryza sativa</i> }	4,81
chr3_jgvv132_10_t01	AtHVA22a { <i>Oryza sativa</i> }	3,91
chr3_random_jgvv114_30_t01	AtHVA22a { <i>Oryza sativa</i> }	3,31
chr3_jgvv97_33_t01	AtHVA22a { <i>Oryza sativa</i> }	2,43
chr3_jgvv132_4_t01	AtHVA22a { <i>Oryza sativa</i> }	2,26
chr3_jgvv132_5_t01	AtHVA22a { <i>Oryza sativa</i> }	1,79
chr10_jgvv71_74_t01	ABA-responsive protein-like { <i>Oryza sativa</i> }	1,67
chr17_jgvv0_830_t01	Abscisic acid-induced-like protein { <i>Oryza sativa</i> }	2,63
chr17_jgvv0_389_t01	AtHVA22a { <i>Oryza sativa</i> }	1,23

## 2.8 Surexpression des gènes associés à la signalisation d'un stress biotique

Les plants traités avec *P. oligandrum* surexpriment une « EDS1, enhanced disease susceptibility » (6 transcrits) et une « MLO-like protein 1, murine long bone osteocyte » (3 transcrits) (tableau 11). Les niveaux de stimulation varient de 1,22 à 3,33. Le transcrit le plus faiblement surexprimé code pour une « phytoalexin-deficient 4-1 protein ».

Tableau 11 Principaux gènes de la signalisation de stress biotiques différemment exprimés au cours du temps (de 7 à 21 jours) pour les plants traités avec *P. oligandrum*. Niveaux d'expression exprimés en log 2, l'expression des gènes est significativement différente selon le test statistique Limma à  $p < 0,01$ .

Gène	Description Mapman	Niveau expression
chrn_jgvv227_10_t01	MLO-like protein 1 { <i>Arabidopsis thaliana</i> }	1,31
chr5_jgvv94_143_t01	MLO-like protein 1 { <i>Arabidopsis thaliana</i> }	2,58
chr12_jgvv35_10_t01	MLO-like protein 1 { <i>Arabidopsis thaliana</i> }	2,33
chr17_gsvivt00007852001_t01	EDS1 { <i>Solanum lycopersicum</i> }	3,33
chr17_jgvv0_265_t01	EDS1 { <i>Solanum lycopersicum</i> }	2,95
chr17_jgvv0_266_t01	EDS1 { <i>Solanum lycopersicum</i> }	2,57
chr7_jgvv31_217_t01	Phytoalexin-deficient 4-1 protein { <i>Solanum tuberosum</i> }	1,22

## 2.9 Répression des gènes du statut rédox

Cette catégorie fonctionnelle est principalement réprimée, un seul transcrit similaire à la « Thioredoxin H » est surexprimé à un niveau de 1,82 (tableau 12). Les transcrits les plus réprimés sont une « thioredoxin-like 4 », à -2,43 et une « non-symbiotic hemoglobin class 1 » à -2,97.

Tableau 12 Principaux gènes du statut rédox différenciellement exprimés au cours du temps (7 et 21 jours) pour les plants traités avec *P. oligandrum*. Niveaux d'expression exprimés en log 2, l'expression des gènes est significativement différente selon le test statistique Limma à  $p < 0,01$ .

Gène	Description Mapman	Niveau expression
chr1_jgvv26_117_t01	Thioredoxin H { <i>Nicotiana glauca</i> }	1,82
chr19_jgvv14_451_t01	Thioredoxin-like 4 { <i>Nicotiana glauca</i> }	-2,43
chr10_jgvv42_32_t01	Thioredoxin x { <i>Arabidopsis thaliana</i> }	-1,81
chr10_jgvv42_18_t01	Thioredoxin x { <i>Arabidopsis thaliana</i> }	-1,47
chr3_jgvv63_183_t01	Non-symbiotic hemoglobin class 1 { <i>Citrus unshiu</i> }	-2,97
chr18_jgvv41_132_t01	Non-symbiotic hemoglobin class 1 { <i>Citrus unshiu</i> }	-1,91

## 2.10 Etude des sous-catégories fonctionnelles

Parmi les catégories fonctionnelles non significativement exprimées selon l'analyse statistique sous Mapman, certaines sous-catégories, associées à la régulation des protéines et aux facteurs de transcription, peuvent être statistiquement significativement modifiées au niveau de leur expression. Les gènes qui les représentent codent pour des fonctions importantes dans l'interaction plante / micro-organismes. Elles sont décrites ci-après.

### 2.10.1 Etude des gènes associés à la régulation des protéines

La sous-catégorie « protéines de dégradation » de la famille des subtilases est significativement différenciellement exprimée ( $p = 1,97 \times 10^{-2}$ ). Les transcrits de subtilases associés sont exclusivement surexprimés de 1,20 à 2,84 (tableau 13). Des gènes codant pour des peptidases/subtilases et un « cucumisin-precursor » sont essentiellement présents.

Tableau 13 Principaux gènes de la sous-catégorie des protéines de dégradation de la famille des subtilases différentiellement exprimés au cours du temps (7 et 21 jours) pour les plants traités avec *P. oligandrum*. Niveaux d'expression exprimés en log 2, l'expression des gènes est significativement différente selon le test statistique Limma à  $p < 0,01$ .

Gène	Description Mapman	Niveau expression
chr10_jgvv3_202_t01	subtilase { <i>Arabidopsis thaliana</i> }	2,62
chr11_jgvv16_75_t01	subtilase { <i>Arabidopsis thaliana</i> }	1,2
chr13_jgvv19_264_t01	Cucumisin precursor { <i>Cucumis melo</i> }	2,65
chr13_jgvv19_263_t01	Cucumisin precursor { <i>Cucumis melo</i> }	2,56
chr13_jgvv19_265_t01	Cucumisin precursor { <i>Cucumis melo</i> }	2,4
chr11_jgvv103_19_t01	subtilase { <i>Arabidopsis thaliana</i> }	2,29
chr9_jgvv2_33_t01	AT3g14240/MLN21_2 { <i>Arabidopsis thaliana</i> }	1,7
chr15_jgvv48_172_t01	subtilase { <i>Arabidopsis thaliana</i> }	2,84
chr2_jgvv25_417_t01	subtilase { <i>Arabidopsis thaliana</i> }	1,74

### 2.10.2 Etude des facteurs de transcription

Ces facteurs interviennent dans la régulation de la transcription. Ils constituent un groupe important de gènes de régulation qui joue un rôle central dans le contrôle de l'expression des réponses à un stress par la plante (Huang *et al.* 2013). Le traitement des racines par *P. oligandrum* modifie l'expression de 26 gènes qui codent pour des facteurs de transcription. Parmi eux, la sous catégorie AP2/ERF (Ethylene-responsive factor) est la plus significative des catégories de régulation de la transcription de l'ARN avec une  $p$ -valeur à  $2,36 \times 10^{-3}$  (tableau 7). Les 14 gènes transcrits appartenant à cette famille et qui sont les plus significativement induits sont représentés dans le tableau 14. Le transcrit le plus surexprimé est similaire à un facteur de transcription CBF-like, son niveau atteint 4,23. Ces gènes sont fortement surexprimés à l'exception d'une « DNA-binding » (-2,74).

Une autre famille de gènes appartenant aux facteurs de transcription, bHLH (basic helix-loop-helix), est fortement induite (annexe 1) par 8 transcrits dont 4 avec un niveau d'expression supérieur à 3.

Tableau 14 Principaux gènes de la sous catégorie « régulation de la transcription de l'ARN » (AP2/ERF, Ethylene-responsive factor) différentiellement exprimés au cours du temps (7 et 21 jours) pour les plants traités avec *P. oligandrum*. Niveaux d'expression exprimés en log 2, l'expression des gènes est significativement différente selon le test statistique Limma à  $p < 0,01$  (avec un niveau d'expression  $> 1,5$  ou  $< -1,5$ ).

Gène	Description Mapman	Niveau expression
chr11_jgvv16_298_t01	AP2/ERF transcription factor family { <i>Arabidopsis thaliana</i> }	4,23
chr2_jgvv25_126_t01	Dehydration responsive element-binding { <i>Soybean</i> }	3,63
chr16_jgvv100_89_t01	CBF-like transcription factor { <i>Vitis riparia</i> }	3,19
chr3_jgvv63_43_t01	AP2/ERF transcription factor family { <i>Arabidopsis thaliana</i> }	3,15
chr17_jgvv0_217_t01	CBF-like transcription factor { <i>Vitis riparia</i> }	3,04
chr4_jgvv8_208_t01	AP2/ERF transcription factor family { <i>Arabidopsis thaliana</i> }	2,76
chr19_jgvv14_197_t01	Ethylene response factor 3 { <i>Cucumis sativus</i> }	2,74
chr19_jgvv138_4_t01	CBF-like transcription factor { <i>Vitis riparia</i> }	2,43
chr7_jgvv31_64_t01	Ethylene-binding protein-like { <i>Oryza sativa</i> }	2,4
chr2_jgvv25_404_t01	CBF-like transcription factor { <i>Vitis riparia</i> }	2,36
chr16_jgvv100_87_t01	AP2/ERF transcription factor family { <i>Arabidopsis thaliana</i> }	2,08
chr18_jgvv1_291_t01	Dehydration-responsive element binding protein 3 { <i>Solanum lycopersicum</i> }	1,8
chr12_jgvv59_27_t01	Dehydration responsive element-binding { <i>Soybean</i> }	1,7
chr5_jgvv29_102_t01	AP2/ERF transcription factor family { <i>Arabidopsis thaliana</i> }	-2,74

## 2.11 Etude de l'expression de certains gènes particuliers

Certains gènes présentent un intérêt car ils sont statistiquement différentiellement exprimés (Limma,  $p < 0,01$ ) même si la catégorie ou sous catégorie à laquelle ils appartiennent n'est pas significativement modifiée dans son expression globale. Ces gènes sont impliqués dans les processus de régulation, en particulier un nombre relativement important de transcrits est impliqué dans la régulation du calcium et dans les récepteurs kinases. Pour ce qui est des gènes impliqués dans la régulation du calcium, 25 transcrits sont surexprimés (annexe 1), 2 sont faiblement réprimés ( $> -1,5$ ) et 11 sont fortement induits ( $> 2$ ). Concernant les gènes codant pour les récepteurs kinases (annexe 1), 44 transcrits sont induits, 3 sont faiblement réprimés ( $\leq -1,5$ ) et 19 fortement exprimés ( $> 2$ ). Parmi eux les deux plus significatifs ( $> 3$ ) sont les récepteurs portant des motifs répétés riches en leucine, de type LRR XI et III.

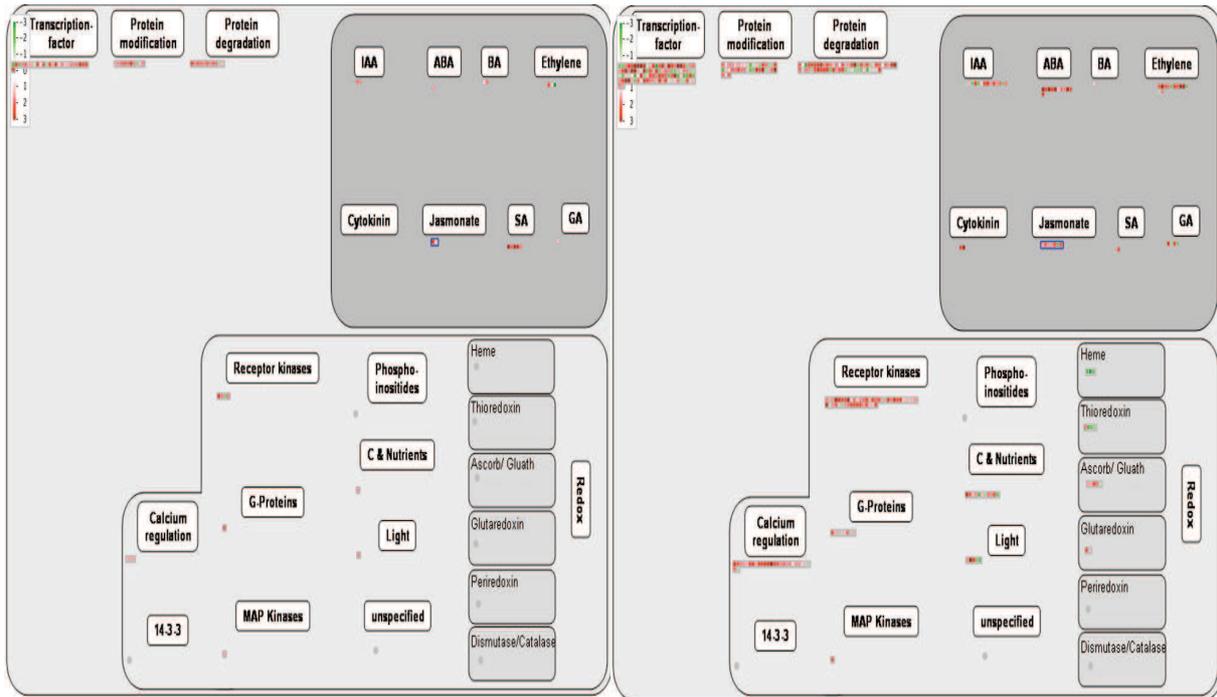


Figure 5 Visualisation à l'aide de Mapman des gènes associés aux processus de régulation de la plante. Seuls les gènes différentiellement exprimés au cours du temps (7 et 21 jours) pour les plants colonisés par *P. oligandrum* (à droite) et les témoins (à gauche) sont indiqués. Chaque carré représente un gène. Plus un gène est fortement induit plus il est rouge foncé. A l'inverse plus il est réprimé plus il est vert foncé.

Concernant la famille des protéines PR (annexe 1), 16 gènes sont significativement différentiellement exprimés chez les plants colonisés par *P. oligandrum*, mais de manière assez faible. Dix d'entre eux ont un niveau d'expression inférieur à 2, et 3 gènes sont réprimés. Les 2 gènes les plus fortement réprimés sont un précurseur de chitinase (« Chitinase precursor ») et une « Cystatin-like protein » avec respectivement -2,6 et -2,4 comme niveau de répression. Les 2 gènes les plus fortement surexprimés codent pour une « major latex-like protein », leur niveau d'expression est de 2,3 et 4. Chez les plants témoins, une seule protéine PR, « Thaumatin-like » protéine, SCUTL2 » est activée au cours du temps.

### 2.12 Validation des microarrays par RT-PCRq

La figure 6 présente la corrélation obtenue par comparaison des valeurs d'expression entre microarrays et RT-qPCR selon différents gènes et pour les plants traités avec *P. oligandrum*. Les niveaux de corrélation obtenus confirment la relation entre les valeurs du niveau d'expression des gènes ou « Fold change » obtenues avec les deux techniques utilisées ( $r^2 = 0,59$ ).

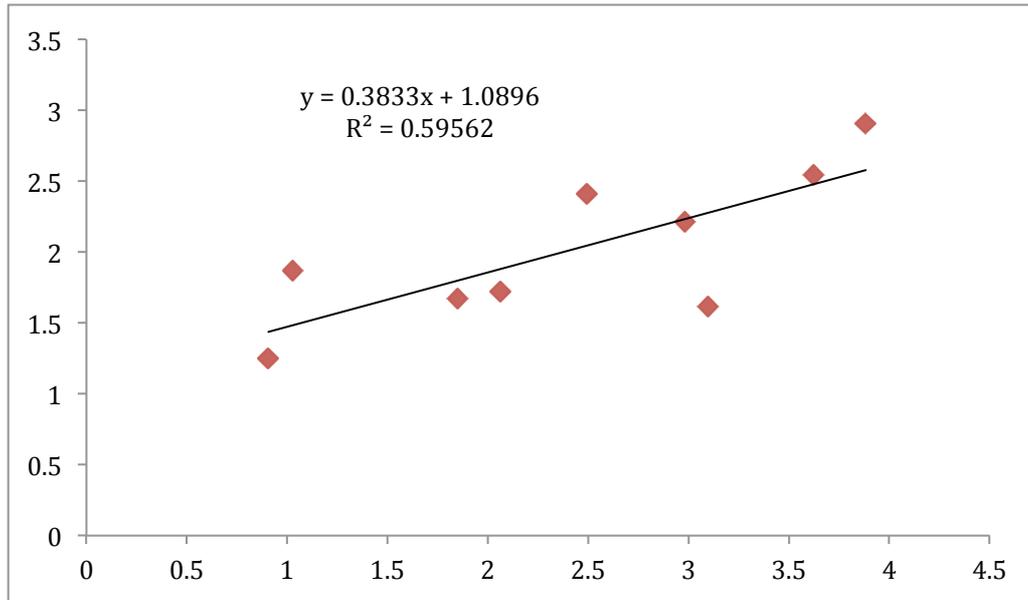


Figure 6 Validation du niveau d'expression des microarrays par RT-PCRq. Correlation en  $\log^2$  des expressions relatives pour les plants traités avec *P. oligandrum*. Un point (en rouge) représente un gène étudié (ascorbate peroxidase, terpenoid synthase 1, chalcone synthase, gibberelin induced protein, jasmonate allene oxidase, leucoanthocyanidin dioxygenase, salicylic acid carboxyl methyltransferase et major latex like protein). Les valeurs d'expressions relatives obtenues par RT-PCRq sont représentées en abscisse et les valeurs obtenues par microarray en ordonnée.



## Discussion-conclusions

Différents travaux scientifiques ont montré la particularité de l'interaction entre l'agent de biocontrôle, *P. oligandrum*, et la plante hôte (Le Floch *et al.* 2005 ; Rey *et al.* 1998a). Toutefois, à notre connaissance, aucune approche de transcriptomique n'avait été entreprise afin d'étudier l'originalité de cette relation. Dans cette étude, des microarrays Nimblegen-vigne ont été utilisés pour caractériser les réponses globales de jeunes plants de vigne lorsque *P. oligandrum* colonisait leurs racines.

Au préalable, la colonisation racinaire des plants au cours du temps a été vérifiée. Suite à une inoculation par un mélange de mycélium et d'oospores, l'oomycète colonisait les racines de boutures de Cabernet Sauvignon à des taux relativement importants. *P. oligandrum* était détecté, en moyenne, sur 13% à 42%. Cette propriété à persister sur les racines de vigne est en accord avec les précédents travaux consistant à prélever des souches de l'oomycète à partir du vignoble Bordelais et confirme l'intérêt d'utiliser des souches de *P. oligandrum* naturellement présentes sur ce végétal (Gerbore *et al.* 2013, soumis). En effet, l'inoculum contenant une souche locale de vigne (inoculum n°2) colonisait à un taux supérieur les racines, en comparaison à l'inoculum uniquement composé de souches provenant d'autres pays, *i.e.* Danemark et Pays-Bas, et d'autres plantes. Ce point est particulièrement important dans le cadre d'une stratégie de lutte biologique, il peut expliquer la variabilité des résultats obtenus en plein champ avec ce type d'agent (Alabouvette *et al.* 2009).

La colonisation des racines de vigne par *P. oligandrum* est associée à d'importantes modifications au niveau des voies métaboliques de la plante. En effet, les analyses transcriptionnelles par microarrays ont permis d'identifier de nombreux gènes différemment exprimés au cours du temps. La vigne répond à la présence de *P. oligandrum* via une modification dans l'expression de gènes impliqués dans les processus biologiques et les fonctions cellulaires, plus précisément chez ceux associés à la réponse à un stimulus, dans l'activité de transduction de récepteurs, de signaux et de molécules. Certains gènes sont réprimés, mais la majorité d'entre eux sont stimulés au cours du temps. Ces modifications sont discutées ci-après.

### *P. oligandrum* active la voie de signalisation du calcium

Le flux de calcium,  $Ca^{2+}$ , est un des premiers événements dans l'immunité primaire de la plante (Dodd *et al.* 2010 ; Tena *et al.* 2011), en réponse à la présence de micro-organismes pathogènes ou symbiotiques, via la détection de MAMPs. Par exemple, un

éliciteur glycoprotéique de la famille des élicitines, la cryptogéine, après perception par la plante, active des protéines kinases qui déclenchent un influx de  $Ca^{2+}$  (Lecourieux-Ouaked *et al.* 2000). Dans notre étude, les plants traités avec *P. oligandrum* ont plusieurs protéines kinases activées, *i.e.* LRR III, XI, XII, ainsi que la voie de signalisation du calcium. On peut émettre l'hypothèse que les élicitines-like de *P. oligandrum*, *i.e.* l'oligandrine qui est extracellulaire, ou les POD 1 et 2, qui sont pariétales, peuvent induire ou être fortement associées à ce phénomène.

#### *Induction par P. oligandrum de gènes de résistance*

Les micro-organismes, dont les oomycètes, sécrètent des effecteurs pour contourner la première ligne de défense de la plante, la PTI (PAMP-Triggered Immunity) (Dangl et Jones 2001), le végétal montre alors une sensibilité à l'agent pathogène. Néanmoins la plante possède des protéines de résistance transcrites à partir des Rgènes, et la reconnaissance de ces effecteurs permet le développement d'une résistance appelée race-spécifique (Hein *et al.* 2009, Stassen *et al.* 2011).

Horner *et al.* 2012 ont montré que de nombreux transcrits émis par *P. oligandrum* codent pour des pectinases. Ils ont émis l'hypothèse que ces résidus de pectines, libérés dans les cellules de la plante hôte durant sa progression dans les tissus racinaires, auraient certainement un rôle d'éliciteurs. *P. oligandrum* posséderait ainsi plusieurs mécanismes pour activer l'immunité des plantes (Benhamou *et al.* 2013). En réponse à cette colonisation des tissus racinaires, 30 gènes de résistance (de la famille des Rgenes) sont significativement induits chez les racines de vigne, dont des gènes codant pour la famille des récepteurs de type NBS-LRR. Cette information indique que l'interaction *P. oligandrum* / vigne serait de type race-spécifique. On peut noter que ce résultat est obtenu pour la première fois chez un oomycète non-pathogène de plante. Ce phénomène est néanmoins cohérent avec la capacité des oomycètes à moduler les réponses de défense des cellules de l'hôte via un important arsenal d'effecteurs, sécrétés à la fois au niveau apoplastique et cytoplasmique (Kamoun 2006).

#### *Le métabolisme secondaire est modifié*

Deux voies du métabolisme secondaire sont modifiées suite à l'interaction des racines avec *P. oligandrum* : (1) la voie des terpenoïdes et (2) celle des flavonoïdes.

(1) La biosynthèse des terpenoïdes est finement régulée par la plante car ils interviennent dans sa croissance ainsi que dans le développement et la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Nagegowda 2010 ; Tholl 2006 ; Vranovà *et al.* 2012). Dans le cas présent, elle

peut correspondre à une réponse de la plante suite à la colonisation par les filaments de *P. oligandrum*.

Dans une étude récente des gènes potentiellement codants pour les terpènes synthèses chez la vigne, 39 gènes ont été caractérisés au niveau de leurs fonctions (Martin *et al.* 2010). Certains de ces gènes sont localisés sur le chromosome 19. Dans notre étude, *P. oligandrum* induit également plusieurs gènes de la famille des terpènes synthèses localisés sur ce même chromosome. Il serait intéressant de comparer ces gènes avec ceux décrits par Martin *et al.* (2010) afin de déterminer plus précisément leurs rôles dans l'interaction. Ce travail nécessite cependant la vérification préalable de la spécificité des sondes micro-arrays ; en effet, à la sonde associée aux terpènes synthèses peut correspondre un ou plusieurs gènes de la même famille. Une autre approche plus rapide et plus précise, par PCRq, permettrait de cibler, à partir d'amorces spécifiques, quels gènes de la famille des terpènes synthèses sont induits.

(2) La voie des flavonoïdes est activée par les chalcones synthèses. Ce type d'enzyme est l'élément clé de cette voie et son expression est induite lors de différentes conditions de stress ; par exemple, les UV ou une infection par un agent phytopathogène bactérien ou fongique (Dao *et al.* 2011). Les flavonoïdes sont des composés antimicrobiens qui ont plusieurs fonctions ; ce sont des pigments, des molécules protectrices contre les UV, des phytoalexines, des molécules signaux dans les interactions plantes / micro-organismes, des antioxydants, ou encore des attractifs de pollinisateurs (De Bruyne *et al.* 1999; Kong *et al.* 2003; Marles *et al.* 2003; Yilmaz et Toledo 2004). Lors de l'interaction entre *P. oligandrum* et des racines de tomate, Le Floch *et al.* (2005) avaient montré qu'une réaction précoce (14 heures post-inoculation par *P. oligandrum*) en réponse à la colonisation par l'oomycète, était la production d'une phytoalexine, la rhisitine, par les cellules de la plante. Cette émission était associée au dépérissement irréversible des hyphes de l'oomycète *in planta*. Dans le cas présent, on peut aussi supposer que l'activation de la voie des flavonoïdes conduit à l'émission de phytoalexines, ces molécules n'ont cependant pas encore été identifiées.

#### *La répression des gènes du statut redox*

Une caractéristique de l'interaction *P. oligandrum* / vigne est la répression des gènes impliqués dans le statut redox de la plante. Par exemple ceux codant pour les « non-symbiotic hemoglobins » qui ont la capacité à détoxifier les molécules réactives de l'azote comme l'oxyde nitrique (NO) (Dordas *et al.* 2003 ; Perazzolli *et al.* 2004). Le NO est une

molécule de signalisation clé impliquée dans plusieurs processus tels que la fermeture des stomates, la programmation de la mort des cellules et la résistance aux agents pathogènes (Thiel *et al.* 2011 ; Neil *et al.* 2003). Thiel *et al.* (2011) ont suggéré que la surexpression de « non symbiotic hemoglobin » (AtHB1) pouvait être associée à une stimulation de la voie de l'acide abscissique.

#### *La voie de l'acide abscissique*

Le métabolisme des hormones, et plus précisément celui de l'acide abscissique (ABA), est fortement activé. En présence de *P. oligandrum*, 9 gènes sont transcrits sur les 39 identifiés, rendant cette catégorie significativement induite. Ces transcrits codent principalement pour une famille de gène, la AtHVA22, connue comme ayant un rôle dans la tolérance à différents stress abiotiques, *i.e.* au froid, à la sécheresse, au NaCl (Chen *et al.* 2002). L'ABA est aussi certainement impliqué dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Zhao *et al.* 2005). Cependant, des effets opposés ont été observés sur la résistance aux agents pathogènes. Ainsi le traitement avec l'ABA, protège les plantes contre des agents nécrotrophes, *i.e.* *Alternaria brassicicola* et *Plectosphaerella cucumerina* (Ton et Mauch-Mani 2004). Des mutants déficients en ABA sont plus sensibles à une infection par *Pythium irregulare* et *Leptosphaeria maculans* (Adie *et al.* 2007 ; Kaliff *et al.* 2007). La fermeture des stomates induites par l'ABA protégerait aussi les plantes contre certaines infections bactériennes (Bari et Jones 2009). A l'inverse, d'autres études ont montré que des mutants déficients en ABA sont plus résistants à *Botrytis cinerea*, à *Oidium neolycopersici* chez la tomate et *Fusarium oxysporum* chez *Arabidopsis thaliana* (Bari et Jones 2009). Ces résultats illustrent que l'ABA n'agit pas comme un régulateur positif des défenses de la plante contre tous les agents nécrotrophes, son rôle dépend des interactions plante / pathogène.

Son rôle s'avère complexe et il semble qu'il interagisse avec les voies de signalisation de la SA et JA provoquant un effet favorable ou défavorable pour la protection de la plante selon l'interaction micro-organisme / plante considérée (Bari et Jones 2009 ; Pajot et Regnault-Roger 2008). Il a aussi été montré que l'ABA avait un effet suppressif sur la voie de signalisation de la SA (Hayes *et al.* 2010) et qu'il était impliqué dans le dépôt de callose, la production de FAO et la régulation de l'expression de gènes de défense (Bari et Jones, 2009 ; Jalloul *et al.* 2009).

Dans la littérature scientifique, il a été observé que *P. oligandrum* induisait un dépôt de callose au niveau des sites d'infections par l'agent pathogène (Benhamou *et al.* 1997) et plus globalement, qu'il n'activait pas la voie de la SA (Hase *et al.* 2008 ; Takahashi *et al.* 2006 ; Kawamura *et al.* 2009). L'activation de l'ABA chez les plantes par *P. oligandrum*

pourrait expliquer ces observations.

Il est intéressant de noter que plusieurs transcrits codant pour des gènes impliqués dans la signalisation d'un stress biotique, *i.e.* MLO-like protein 1, sont induits par *P. oligandrum*. Chez l'orge, le gène Mlo est indispensable à la pénétration de l'oïdium dans la paroi de la cellule hôte. En l'absence de ce gène, une résistance importante à l'oïdium a été observée (Büsches *et al.* 1997 ; Humphry *et al.* 2006). Toutefois cette absence cause dans le même temps une hypersensibilité à d'autres agents pathogènes tel que *Magnaporthe grisea* (Jarosch *et al.* 2003). Une hypothèse est que l'induction des MLO faciliterait la pénétration de ces micro-organismes dans la plante (Guether *et al.* 2009).

#### *Facteurs de transcription*

Les principaux facteurs de transcriptions surexprimés par la plante en présence de *P. oligandrum* appartiennent à la famille des ERFs (ethylene-responsive factor), *i.e.* AP2/ERF, et des bHLH (basic helix-loop-helix). Ils sont principalement associés à la résistance aux stress biotiques (Agarwal et Jha 2010). La surexpression des bHLH a été associée à une meilleure résistance au stress abiotique de type froid et au stress oxydatif sur le tabac et le citron (Huang *et al.* 2013). La surexpression du facteur de transcription AP2/ERF dans du tabac transgénique a permis d'augmenter la résistance à l'infection par *Alternaria alternata*, *Ralstonia solanacearum* et le virus de la mosaïque du tabac (TMV) (Zhang *et al.* 2009). Il est possible que la stimulation par *P. oligandrum* de ces facteurs de transcriptions confère à la plante une certaine capacité à se défendre.

*P. oligandrum*, induit des transcrits qui codent pour une « Enhanced Disease Susceptibility 1 » (EDS1) et une « Phytoalexin Deficient 4 » (PAD4). Ces deux gènes sont connus comme agissant de concert et comme ayant un rôle central dans la régulation de la résistance basale aux agents pathogènes biotrophes et hémibiotrophes (Wiermer *et al.* 2005). Gao *et al.* (2010) ont montré des différences de régulation des EDS1 entre un cépage résistant (Norton) et un autre sensible (Cabernet Sauvignon) au mildiou de la vigne. Leurs résultats indiquent que la résistance à *Plasmopara viticola* serait davantage corrélée aux niveaux d'expressions élevés des EDS1, qu'aux différences de fonctions de ces gènes. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que l'induction des EDS1 à des niveaux élevés constitue un indicateur de potentialisation des défenses chez le cépage Norton. L'induction de certains EDS1 par *P. oligandrum* chez le Cabernet Sauvignon pourrait potentialiser les systèmes de défenses de la plante, ce phénomène a déjà été reporté par Benhamou *et al.* (2012) pour *P. oligandrum*.

### *Des similitudes avec les relations symbiotiques ?*

Lors de l'interaction *P. oligandrum* / plante, l'émission de plusieurs transcrits suggère que la plante met en place des systèmes de défense pour contre l'oomycète. Néanmoins, un certain nombre de similitudes avec des interactions de type micro-organismes symbiotiques / racines a été observé. La principale étant la stimulation des subtilases. Au cours des dernières années, il a été montré que ces molécules étaient impliquées dans les interactions symbiotiques des plantes, comme par exemple dans l'interaction entre les racines et les mycorhizes à arbuscules (AM), ou encore entre les légumineuses et les rhizobiums fixateurs d'azote (Takeda *et al.* 2007). Plusieurs gènes de subtilases ont été identifiés chez *Lotus japonicus*, ils sont induits après inoculation avec le champignon *Glomus intraradices* AM et/ou la bactérie fixatrice d'azote *Mesorhizobium loti* (Kistner *et al.* 2005). Cangahuala-Inocente *et al.* (2011) ont étudié l'interaction porte-greffe de vigne et mycorhizes à arbuscules et montré que 2 protéines semblables à une « subtilisin-like protease » étaient sur-accumulées. L'interaction *P. oligandrum* / plante possède un certain nombre de similitudes avec ces micro-organismes symbiotiques de la rhizosphère puisqu'une stimulation des subtilases a été observée dans notre étude.

Les subtilases peuvent aussi avoir un autre rôle, en particulier celui lié à la défense des plantes. Il a en effet été montré qu'une subtilase, la P69B, était ciblée par des facteurs de virulence de l'agent pathogène *Phytophthora infestans*. Au cours du processus infectieux, le pathogène sécrète des Kazal-like proteinase inhibitors (Epi1 et Epi10) qui se fixent et inactivent la subtilase P689B (Tian *et al.* 2004 ; Tian et Kamoun 2005 ; Tian *et al.* 2005). Dans le cas présent, d'autres subtilases sont induites par *P. oligandrum*, suggérant un effet protecteur pour les plantes contre certaines pathologies.

Il est intéressant de noter qu'une étude réalisée par Kawamura *et al.* (2009) après application en traitement foliaire d'*Arabidopsis thaliana* avec 2 protéines élicitrices de la paroi de *P. oligandrum* (POD1 et 2) montrait que des gènes codant, entre autres, pour des subtilases, étaient également fortement surexprimés.

En conclusion, la présence de l'oomycète *P. oligandrum* au niveau des racines de vigne, induit un changement important du transcriptome du végétal. Les résultats au niveau moléculaire ont permis de montrer que la relation établie avec la plante présente quelques aspects de type symbiotique mais plusieurs événements associés à l'induction des systèmes de défense de la plante semblent se mettre en place.

# 5

## Chapitre

# Etude transcriptomique de l'interaction *Vitis vinifera* / *P. oligandrum* / *P. chlamydospora*

## Introduction

Lors des précédents travaux accomplis dans cette thèse, il a été montré au chapitre 1 que *Pythium oligandrum* était un colonisateur fréquent de la rhizosphère de ceps de vigne dans le vignoble bordelais, et que ses souches possédaient des potentialités certaines pour activer les systèmes de défense des plantes du fait des gènes élicitines-like que leur génome possède. Au chapitre 2, les relations entre ce micro-organisme et la vigne, via l'étude de l'interaction établie avec le système racinaire a été étudiée et approfondie par rapport aux études préalables sur ce thème. L'objectif du présent chapitre est d'étudier les conséquences que cette interaction a sur le développement d'une résistance contre un agent pathogène, *Phaeomonliella chlamydospora*, impliqué dans l'esca de la vigne.

Par le passé, plusieurs auteurs ont rapporté que le traitement des plantes avec le mycélium de *P. oligandrum*, ou les protéines élicitrices qu'il possède, induisaient une résistance systémique chez les plantes (Benhamou *et al.* 1997 ; Le Floch *et al.* 2003a ; Lherminier *et al.* 2003 ; Masunaka *et al.* 2010; Mohamed *et al.* 2007 ; Picard *et al.* 2000b ; Takenaka *et al.* 2003, 2006, 2008).

Ce phénomène d'induction de résistance a été particulièrement décrit à partir de la moitié des années 1990 par le groupe français dirigé par le professeur Yves Tirilly (Université de Bretagne Occidentale) en France en collaboration avec l'équipe de la professeure Nicole Benhamou (Université Laval) au Québec. Il avait ainsi été observé

qu'après introduction de *P. oligandrum* dans la rhizosphère, il pénètre rapidement dans les racines et induisait non seulement une résistance locale au niveau racinaire, (Benhamou *et al.* 1997), mais aussi systémique car étendue à l'ensemble de la plante (Benhamou *et al.* 2001 ; Le Floch *et al.* 2003a). En utilisant la microscopie électronique à balayage, Benhamou *et al.* (1997) ont décrit ce phénomène de résistance induite localement dans les racines de tomate infectées par l'agent pathogène *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (*FORL*). Par rapport aux plants témoins infectés uniquement par *FORL*, les plants pré-inoculés par *P. oligandrum* puis infectés par *FORL* montraient un niveau de résistance nettement plus élevé et caractérisé par une réponse rapide et efficace, avec notamment l'accumulation de composés phénoliques et de callose permettant de freiner, voire d'arrêter, la progression de l'agent pathogène.

Le concept d'une stimulation des mécanismes de défense par *P. oligandrum* a été clairement illustré dans le cas de plusieurs autres agents pathogènes tels que *Aphanomyces cochliformis*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* (Benhamou *et al.* 1997 ; Brozova 2002 ; Ikeda *et al.* 2012 ; Le Floch *et al.* 2003a ; McQuilken *et al.* 1992 et 1998 ; Rey *et al.* 2005 ; Takenaka *et al.* 2003 ; Takenaka et Ishikawa 2013). Ce large spectre d'action suggère que la stimulation des défenses de la plante est un phénomène non-spécifique à l'hôte. En ce qui concerne la résistance systémique, Le Floch *et al.* (2003a) ont montré une synthèse accrue de protéines PR, *i.e.* PR-3b, PR-5a et d'une nouvelle isoforme de PR-3b, pour les plants de tomate colonisés au niveau des racines par *P. oligandrum*, puis infectés par *B. cinerea* au niveau des feuilles. Fait intéressant, la synthèse des protéines PR n'est déclenchée chez les plants colonisés par *P. oligandrum* que lorsque les feuilles sont attaquées par l'agent pathogène. Ce phénomène de «potentialisation des systèmes de défense » correspond à un état physiologique particulier qui incite la plante à déclencher ses mécanismes de protection plus rapidement et plus fortement, uniquement lorsqu'elle est attaquée par un agent pathogène (Conrath *et al.* 2002 ; Conrath 2009 ; Jung *et al.* 2009). Ce point doit cependant être nuancé, les analyses réalisées au chapitre 2 du présent manuscrit indiquent que plusieurs voies métaboliques chez la vigne sont induites suite à la colonisation racinaire par *P. oligandrum*.

La recherche de molécules responsables de l'induction de résistance a été initiée par Picard *et al.* (2000a) au début des années 2000. Il est actuellement établi que *P. oligandrum* produit deux types d'éliciteurs, un premier qui est sécrété dans le milieu de culture de l'oomycète et un second extrait de sa paroi cellulaire. Masunaka *et al.* (2010) ont montré que ces deux types d'éliciteurs, *i.e.* l'oligandrine et POD1 et 2, sont spécifiques de l'espèce *P. oligandrum*.

Picard *et al.* (2000b) avaient découvert l'éliciteur extracellulaire, *i.e.* l'oligandrine, dans le filtrat de culture de l'oomycète. Cette glycoprotéine de 10 kDa, avait été classée dans la famille des élicitine-like protéines en raison des similitudes avec la signature classique des élicitines (Ponchet *et al.* 1999). L'oligandrine a été utilisée avec succès comme inducteur de résistance systémique chez le tabac contre une infection par un phytoplasme (Lherminier *et al.* 2003), chez la tomate contre *Phytophthora parasitica*, *B. cinerea* et FORL (Benhamou *et al.* 2001; Lou *et al.* 2011; Picard *et al.* 2000a), et chez la vigne contre *B. cinerea* (Mohamed *et al.* 2007). Cette protéine stimule les réactions de défense de la plante sans pour autant déclencher la réaction d'hypersensibilité (HR) associée à la réponse nécrotique (Picard *et al.* 2000b). Mohamed *et al.* (2007) ont comparé les effets d'une application, au niveau de la rhizosphère de plants de vigne, de l'oligandrine seule ou de *P. oligandrum* sous forme d'oospores, pour lutter contre *B. cinerea*. Le niveau de protection des feuilles de vigne traitées atteignait 75%, aucune différence significative n'ayant été observée entre les deux modalités testées.

Le deuxième type d'éliciteur est aussi classé parmi les élicitine-like protéines (Takenaka *et al.* 2006). Il s'agit de protéines de la paroi cellulaire, codées POD-1 et POD-2 par Takenaka *et al.* en 2003. Une protection par induction de résistance a été obtenue contre des agents pathogènes bactériens et fongiques, *i.e.* *Ralstonia solanacearum* et *Pseudomonas syringae* sur *Arabidopsis thaliana* (Kawamura *et al.* 2009) et *Cercospora beticola*, *Rhizoctonia solanacearum* et *Aphanomyces cochlioides* sur la betterave à sucre (Takenaka *et al.* 2003, 2006; Takenaka et Tamagake 2009) et contre *Fusarium graminearum* sur le blé (Takenaka *et al.* 2003). En ce qui concerne les niveaux de protection obtenus avec POD-1 ou POD-2, Takenaka *et al.* (2006) ont observé des efficacités équivalentes sur la betterave à sucre contre *A. cochlioides*. Néanmoins, une distinction a été observée dans le nombre de gènes liés à la défense induite, 5 gènes pour POD-1 et 3 pour POD-2. Les auteurs ont conclu que les deux éliciteurs pouvaient induire des réactions de défense distinctes pour des niveaux de protection similaires.

La combinaison des deux protéines élicitrices pariétales avec l'oligandrine pourrait stimuler un plus grand nombre de gènes impliqués dans les réactions de défense et accroître le niveau de résistance de la plante. Un autre point intéressant au sujet de ces protéines est qu'elles ne sont pas spécifiques d'une espèce végétale en particulier.

Dans la présente étude, *P. oligandrum* a été utilisé pour réaliser un essai de protection de la vigne contre l'agent pathogène *P. chlamydospora*, un champignon impliqué dans l'esca. Ce dernier fait partie avec *Phaeoacremonium aleophilum*, *Fomitiporia*

*mediterranea* et les *Botryosphaeria* spp. (Bruno et Sparapano 2006 ; Larignon et Dubos 1997; Mugnai *et al.* 1999) du complexe fongique qui dégrade le bois pour aboutir au faciès "amadou" et à l'expression de la maladie sous deux formes, celle dite lente avec des symptômes foliaires typiques, e.g. des colorations internervaires, jaunes ou rouges selon les cépages, qui évoluent vers un dessèchement, et la forme apoplectique où le cep dépérit de façon foudroyante (Mugnai *et al.* 1999). Parmi ces champignons, *P. chlamydospora* est fréquemment rapporté dans les études de pathogénicité comme étant le plus agressif car il est capable de former des lésions plus importantes que les autres espèces (Adalat *et al.* 2000 ; Hallen *et al.* 2007 ; Laveau *et al.* 2009). De plus cet agent pathogène est impliqué dans les premiers stades de développement des nécroses du bois (Comont *et al.* 2010 ; Larignon 2004; Martin *et al.* 2012).

Les objectifs de cette étude sont (1) d'évaluer la résistance induite chez la vigne par *P. oligandrum* pour lutter contre *P. chlamydospora*, (2) d'étudier les mécanismes globaux mis en place par la plante lors de cette interaction tripartite et (3) d'identifier des marqueurs moléculaires d'état de défense, de résistance ou de maladie pour la plante. Pour étudier l'induction de résistance, des analyses par qPCR ont été réalisées. L'analyse globale des réponses de la vigne, e.g. la régulation des voies de signalisation moléculaire, a été faite en utilisant un microarray vigne.

## Matériels et Méthodes

### Cultures fongiques

Les mêmes souches de *P. oligandrum* présentées au chapitre 4 ont été utilisées pour cette étude. En ce qui concerne l'agent pathogène, la souche SO37 de *Phaeoconiella chlamydospora* (mycothèque de l'UMR SAVE, isolé du bois de vigne, dans le sud ouest de la France, 1996) a été sélectionnée car Laveau *et al.* (2009) ont montré qu'elle était relativement virulente. *P. chlamydospora* a été maintenu sur le milieu malt-agar (MA) et les cultures étaient placées à 25 °C à l'obscurité.



Photographie 1 Boutures de Cabernet Sauvignon utilisées lors de l'essai réalisé en serre.

### Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental, répété 2 années consécutives, est constitué des modalités présentées au chapitre 4, il faut y ajouter les essais réalisés avec les plants inoculés par l'agent pathogène et les témoins (experimentation en conditions contrôlées, photographie 1). En résumé, 7 modalités (tableau 1) ont été mises en place, les plants ont été : (1) inoculés au niveau des racines avec l'inoculum n°1 de *P. oligandrum* (mélange de 2 souches CBS 530.74 + CBS 109982), (2) inoculés au niveau des racines avec l'inoculum n°2 (mélange de 2 souches CBS 118746 + P5), (3) infectés par l'agent pathogène *P. chlamydospora* au niveau du tronc, (4) inoculés au niveau des racines par l'inoculum 1 et infectés par *P. chlamydospora* au niveau du tronc, (5) inoculés au niveau des racines par l'inoculum 2 et infectés par *P. chlamydospora* au niveau du tronc, (6) percés au niveau du tronc (témoins pour mimer le processus d'inoculation par *P. chlamydospora*), (7) non-inoculés par *P. oligandrum* et non-infectés au niveau du tronc (autre modalité témoin).

Tableau 1 Synthèse des traitements réalisés sur les boutures de Cabernet Sauvignon en serre.

Traitement n°	Traitement au niveau	
	Racinaire	Tronc
1	<i>P. oligandrum</i> (inoculum n°1)	-
2	<i>P. oligandrum</i> (inoculum n°2)	-
3	-	<i>P. chlamydospora</i>
4	<i>P. oligandrum</i> (inoculum n°1)	<i>P. chlamydospora</i>
5	<i>P. oligandrum</i> (inoculum n°2)	<i>P. chlamydospora</i>
6	-	perçage + disque de malt-agar
7	-	-

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

Elle est identique à celle décrite lors du chapitre 4 (page 115)

### Infection des jeunes plants de vigne par l'agent pathogène *P. chlamydospora*

Une semaine après la première inoculation par *P. oligandrum*, l'infection avec *P. chlamydospora* a été réalisée comme décrite par Laveau *et al.* (2009). Brièvement, l'agent pathogène *P. chlamydospora* souche SO37 a été déposé sous forme de disque de mycélium dans la bouture préalablement percée à 4 mm de profondeur et à 2 cm sous le premier bourgeon (photographie 2a). Afin d'empêcher la pénétration d'autres champignons, le trou a été immédiatement refermé avec de la paraffine (photographie 2b). Les trous des plants témoins percés ont été inoculés par un disque de gélose provenant du milieu synthétique malt-agar.



Photographie 2 Inoculation de l'agent pathogène, *P. chlamydospora* au niveau de la tige des boutures de Cabernet Sauvignon après perçage (a) puis fermeture du trou avec de la paraffine (b).

### **Prélèvement des échantillons végétaux**

Chaque année, des prélèvements de tronc ont été réalisés au cours de l'essai durant une période d'environ 4 mois (août à mi-décembre 2010 et juillet à octobre 2011).

Cinq prélèvements ont été réalisés : T0 (soit 2h après l'infection avec *P. chlamydospora*), T+J7 (soit 7 jours après inoculation par l'agent pathogène), T+J14, T+J28, T+J56 et T+J114. Neuf boutures par modalité (3 plants \* 3 répétitions) ont été prélevées à chaque date et 30 boutures par modalités à T+114 jours pour mesurer les nécroses produites par *P. chlamydospora*. Une partie des échantillons a été utilisée pour des analyses par méthode culturale et l'autre partie a été congelée à -80°C pour les analyses en transcriptomique afin d'étudier les réponses de la plante aux micro-organismes.

### **Evaluation de l'implantation de *P. oligandrum* au niveau des racines par méthode culturale**

La méthode présentée au chapitre 4 a été utilisée pour évaluer les niveaux de colonisation racinaire par *P. oligandrum* (page 115).

### **Evaluation de la protection induite chez la vigne par *P. oligandrum* contre *P. chlamydospora***

Cent quatorze jours après l'infection par *P. chlamydospora*, 30 plants (soit 10 par répétition) par modalité ont été prélevés. Le tronc a été sectionné longitudinalement, une partie a été utilisée pour mesurer la longueur des nécroses dues à *P. chlamydospora* et l'autre a été conservée à -80°C pour l'étude transcriptomique. Le taux de nécrose a été obtenu en calculant le rapport entre la longueur de la nécrose et la longueur totale du tronc de la bouture. Une analyse de variance (ANOVA-logiciel R) a été réalisée sur le taux de nécroses afin d'évaluer les différences entre modalités

### **Extractions de l'ARN des jeunes plants de vigne**

Pour les analyses par microarrays, les ARN du tronc ont été extraits avec le kit commercial Qiagen plant (QIAGEN), selon les recommandations du fournisseur. Les échantillons de tronc ont préalablement été broyés en poudre fine dans de l'azote liquide avec un broyeur à bille TissueLyserII (Qiagen).

Pour chaque modalité analysée, 400 mg de poudre de chacune des 3 boutures prélevées ont été pesés et regroupés en un « pool ». Ainsi 3 « pools » de 3 boutures, correspondant aux 3 répétitions par modalité, ont été obtenus.

Les ARN ont ensuite été extraits à partir de 100 mg de chaque « pool ». Après traitement à la DNaseI (Invitrogen) pour éliminer les traces d'ADN, les échantillons d'ARNs ont été dosés au nanodrop (Nanodrop, ND-1000, ThermoScientific, Labtech Nanodrop) et leurs niveaux de qualité (pureté et état de dégradation) ont été contrôlés au Bioanalyser (Agilent).

### **Etape de purification des ARN et validation de leur qualité**

Elle est identique à celle réalisée lors du chapitre 4 (page 116)

### **Transcription réverse (RT) des ARNs messagers en ADNc**

Après obtention d'ARN de bonne qualité, 0,5 µg d'ARN totaux ont été rétro-transcrits en ADNc en utilisant, pour chaque échantillon, 1µl d'oligo d(T)<sub>12-18</sub> (500µg.ml<sup>-1</sup>) et 1µl de dNTP Mix (10Mmq dATP, dGTP, dCTP et dTTP). Le mélange a été chauffé pendant 5 minutes à 65°C pour dénaturer les structures secondaires de l'ARN puis incubé dans la glace pour figer la réaction et fixer les oligo-dTs. Puis, 4µl de 5X Strand Buffer, 2µl de DTT à 0,1 M et 1µl de RNaseOUT™ TM (40U.µl<sup>-1</sup>) inactivant les inhibiteurs d'ARN ont été ajoutés. Après incubation pendant 2 minutes à 37°C, 1µl de la reverse transcriptase M-MLV (Invitrogen™, Life technologies, France) a été ajouté.

La réaction de synthèse des ADNc a été effectuée à 37°C pendant 50 min puis a été arrêtée par incubation à 75°C pendant 15 min. Les ADNc obtenus ont été stockés à -20°C avant utilisation.

### **Analyse des gènes de défense de la vigne par PCR quantitative**

Le niveau d'expression de 22 gènes impliqués dans les défenses de la vigne (Dufour *et al.* 2012) a été quantifié par PCR quantitative en temps réel et exprimé de façon relative en utilisant EF1γ (Chaîne gamma du facteur d'élongation) et GAPDH (Glyceraldéhydes-3-phosphate déshydrogénase) comme gènes normalisateurs (tableau 2).

Tableau 2 Liste des gènes utilisés pour l'étude de l'expression des gènes de défenses de la vigne.

Gènes	Abrév.	Gènes	Abrév.
<b>Références</b>		<b>Phénylpropanoïdes</b>	
Chaîne gamma du facteur d'élongation	EF1 $\gamma$	Phénylalanine ammonia lyase	PAL
Glycéraldéhydes-3-phosphate déshydrogénase	GADPH	Stilbène synthase	STS
<b>Indoles</b>		Chalcone isomérase	CHI
Antranilate synthase	ANTS	Chalcone synthase	CHS
Chorismate mutase	CHORM	Leucoanthocyanidine dioxégénase	LDOX
Chorismate synthase	CHORS	Anthocyanidine réductase	BAN
<b>Paroi</b>		<b>PR-proteïnes</b>	
Callose synthase	CALS	PR protéïnes de classe 1	PR1
Peroxydase	PER	PR protéïnes de classe 10	PR10
Coniferyl alcohol glucosyl transferase	CAGT	Chitinase de classe III	CHIT3
<b>Autres</b>		Chitinase de classe IV	CHIT4
9-Lipoxygénase	9-LOX	Protéïne inhibant les polygalacturonases	PGIP
Glutathione S-transférase	GST	B-1,3 glucanase	GLU
Acide 1-aminocyclopropane, 1-carboxylique oxydase	ACC	Inhibiteur de sérine protéase	PIN

Les 22 gènes choisis codent pour plusieurs types de protéïnes : des protéïnes PR, d'autres impliquées dans la synthèse de la paroi, dans la voie des phénylpropanoïdes et dans le métabolisme du tryptophane. Des gènes, impliqués dans la voie de synthèse des oxypilines et celle de l'éthylène ont également été étudiés (figure 1). Un niveau d'expression relatif est considéré fortement significatif lorsque il est supérieur à 2 ou inférieur à -2, seuil ou le gène est 2 fois plus ou 2 fois moins exprimé par rapport au témoin choisi.

Pour chaque gène et pour chaque modalité, une valeur de Ct moyen (threshold Cycle) est obtenue, représentant la valeur du nombre de cycle de PCRq à partir duquel le seuil de fluorescence devient significativement différent du bruit de fond. Ensuite les  $\Delta Ct$  sont déterminés pour chaque gène et pour chaque modalité comme étant la différence du Ct du gène étudié et des Ct des deux gènes de référence (EF1 $\gamma$  et GAPDH) :  $\Delta Ct1 = Ct(\text{gène } x) - Ct(\text{EF1 } \gamma)$  et  $\Delta Ct2 = Ct(\text{gène } x) - Ct(\text{GAPDH})$ .

L'expression relative (ER) des gènes est ensuite calculée en appliquant la formule suivante :  $ER = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  où  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{modalité étudiée}) - \Delta Ct(\text{modalité témoin})$ . L'expression relative est normalisée en réalisant la moyenne géométrique des deux expressions relatives obtenues par rapport aux 2 gènes de référence EF1 $\gamma$  et GAPDH (Vandesompele, 2002).

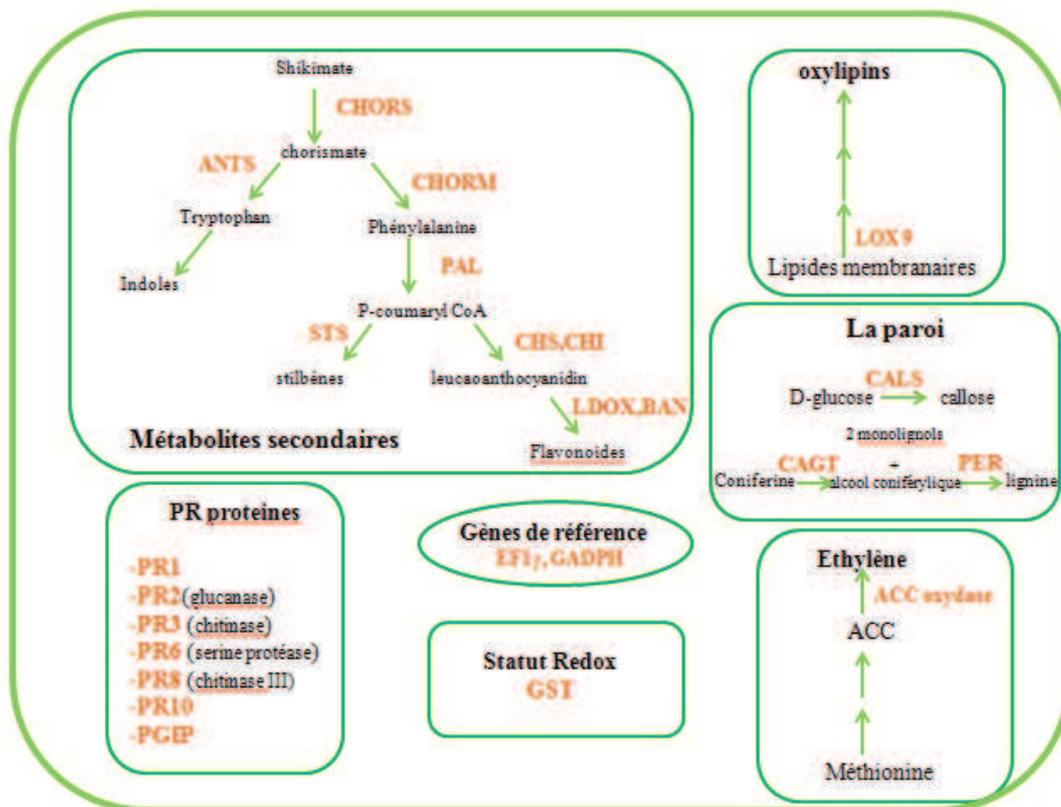


Figure 1 Synthèse des gènes utilisés pour l'étude de la réponse de défense de la vigne en fonction de la voie de signalisation ou des métabolites secondaires.

Les valeurs d'expression relative comprises entre 0 et 1 correspondent à des répressions de gènes et subissent une transformation de variable en appliquant la formule suivante :  $[-1/ER]$  afin d'obtenir une même échelle entre les surexpressions et les répressions des gènes. Les résultats seront présentés sous formes de tableaux faisant apparaître les valeurs d'expressions relatives associées à un gradient de couleurs allant du vert pour les gènes ayant une expression relative inférieure ou égale à -2 au rouge pour des expressions relatives supérieures ou égales à 2, en passant par le blanc pour les expressions relatives égales à 1.

Les réactions de PCRq sont réalisées en plaques de 96 puits où chacun des gènes est analysé en duplicat. Le thermocycleur (Stratagène MX3005P, Agilent technologies, France, Ivry sur Seine) est programmé pour 1 cycle de 15 min à 95°C puis 45 cycles en boucle de 50 s (10 s à 95°C, 20 s à 55°C et 20 s à 72°C) en utilisant le SYBR® Green pour détecter la synthèse de l'ADN double-brin.

Le volume final par puits est de 14 µl et contient 7 µl de SYBR® Green Fluorescein mix, 2 µl de chaque amorce F+R (Forward + Reverse) à 1 µM et 5 µl de DNAc produits précédemment. Ainsi, pour chaque gène et pour chaque modalité on obtient une valeur de Ct qui est donc liée à la quantité d'ARN exprimée dans les cellules du bois et qui nous permet d'obtenir une expression relative de l'expression de chaque gène en fonction des modalités témoins. Afin de tester si les différences observées sont statistiquement significatives, un test de Kruskal-Wallis (test non paramétrique pour données à effectif faible et qui ne suivent pas une loi normale) a été utilisé. L'analyse a été réalisée à l'aide du logiciel Systat (version 4.1).

## Microarray

Pour les analyses micro-arrays, la démarche suivie dans l'étude transcriptomique au niveau du tronc a été similaire à celle des racines (cf chapitre 4). Pour la validation des niveaux d'expression des micro-arrays par RT-PCRq, 14 gènes ont été testés. Les trois gènes de référence utilisés sont identiques à ceux des racines.

Tableau 3 Amorces utilisées pour la validation des données microarrays par PCRq.

Identifiants du gène*	Fonction	Catégorie fonctionnelle Mapman	Sens (5'>3')	Anti-sens (3'>5')
V0 - 12X V1 - 12X				
chr11_jgvv16_101_t01 Vv11s0016g01220	Auxin-binding protein	20.2.99 stress.abiotic.unspecified	CAAGTGAATGG GGCTGGGAT	AAGGATCTGGAGA CCAGGCT
chr18_jgvv1_77_t01 Vv18s0001g01130	Expansin	10.7 cell wall.modification	GGTGGACTAAA GCTCACGCT	AATGCTGTGCTCAA AGCTGC
chr5_jgvv20_35_t01 Vv05s0020g00420	Polygalacturonase	10.6.3 cell wall.degradation.pectate lyases and polygalacturonases	TCAACAATCTTC TCCGGCCC	TTCCGCTTCTGTG AAGGTC
chr7_jgvv31_232_t01 Vv07s0031g02550	ABC transporter	34.16 transport.ABC transporters and multidrug resistance systems	TTCGTGGCTCA GAAGGACAC	ATCAACTGTGCCGG AGGAAG
chr14_jgvv66_158_t01 Vv14s0066g01730	Glycosyl-transferase	10.2 cell wall.cellulose synthesis	GTCCTACATGG CTTGGCTGT	CGGGCTTCACTTC TTGTGC
chr1_jgvv11_349_t01 Vv01s0011g03090	Allene oxide cyclase	17.7.1.4 hormone metabolism. jasmonate.synthesis-degradation. allene oxidase cyclase	CTGAGTCAGAA GCCAGCCAA	CTCCAGGTCTCCGG TGTAGA
chr10_jgvv3_374_t01 Vv10s0003g04200	Phospholipase	11.9.2.1 lipid metabolism.lipid degradation.lipases.triacylglycerol lipase	TCTGGCTTCAGT TGGAGTGCR	GCTGATTCCGGAG AGCTGTT
chr13_random_jgvv123_27_t01 Vv13s0067g03700	Terpenoid Synthase	16.1.5 secondary metabolism. isoprenoids.terpenoids	ATGGAGATGGG CATGGTGTTT	TGACAACTTCTAG ACCAGGGG
chr18_jgvv1_338_t01 Vv18s0001g06090	Glycosyl-transferase	26.2 misc.UDP glucosyl and glucuronyl transferases	GGCCTGGAGT GGAAGACTC	TCGCTGAGTTGGG ACATTTCG
chr19_jgvv140_8_t01 Vv19s0140g00120	Dioxygenase	17.6.1.13 hormone metabolism. gibberelin.synthesis-degradation.GA2 oxidase	ACGTGTTCTCC AAAGCCCT	TGGCAGGCTTCAAT GAGGAG
chr2_jgvv25_272_t01 Vv02s0025g02960	Dioxygenase	17.5.1 hormone metabolism. ethylene.synthesis-degradation	CGCAACCAGAG CTGACCTAT	TTAAGACCTGCAAC CCAGGC
chr3_jgvv91_89_t01 Vv03s0091g00310	Auxin-responsive protein	17.2.3 hormone metabolism. auxin.induced-regulated-responsive-activated	CCGAGAAGGAT GCAAAAGCG	GACCGTTGACCCTT CCAGTT
chr6_jgvv80_106_t01 Vv06s0080g00090	Cytochrome P450	26.10 misc.cytochrome P450	CTTTCTCGGCCA TCTTGGGT	GAGCTCCAGACTCG CCATTT
chr9_jgvv2_42_t01 Vv09s0002g00570	GDSL lipase	26.28 misc.GDSL-motif lipase	TAGGGCCTCTG GGTTGTGTA	TTTGAATCTGGGTA GGCGGG

## Résultats

### 1. Evaluation de l'implantation de *P. oligandrum* par méthode culturale

La persistance de *P. oligandrum* dans la rhizosphère des plants a été évaluée durant une période de 114 jours (tableau 4). L'analyse de variance (ANOVA) a permis de vérifier qu'il n'y avait pas d'effet bloc lors de l'expérience, les données ont été obtenues à partir de 9 plants échantillonnés par modalité, en 2010 et en 2011. Lors du chapitre précédent, il a été montré que *P. oligandrum* colonisait durablement la rhizosphère des plants de Cabernet Sauvignon durant les 4 mois de l'expérimentation. La colonisation des plants traités avec *P. oligandrum* et inoculés par l'agent pathogène a également été suivie (tableau 4).

Tableau 4 Colonisation racinaire de *P. oligandrum* évaluée par méthode culturale en 2010 et 2011. Les valeurs reportées sont les moyennes (en %) ± Erreur Standard, de 9 plants échantillonnés (20 racines par plant). Jpi= jour post inoculation de l'agent pathogène *P. chlamydospora*. Les moyennes avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à  $p < 0,05$  (mixed ANOVA), Pch= *P. chlamydospora*.

Traitement	Colonisation racinaire	
	2010	2011
<i>0 jpi</i>		
Inoc1 + Pch	29,4 ± 9,4 cd	33,3 ± 10,9 ab
inoc 2+ Pch	46,1 ± 12,2 abc	45,6 ± 10,9 a
Témoin	0,60 ± 0,6 f	0 ± 0 c
<i>14 jpi</i>		
Inoc1 + Pch	17,2 ± 7,5 d	25,6 ± 11,1 b
inoc 2+ Pch	40 ± 10,7 abc	27,2 ± 11,2 b
Témoin	0,60 ± 0,6 f	0 ± 0 c
<i>28 jpi</i>		
Inoc1 + Pch	36,7 ± 9,7 bcd	36,1 ± 12,9 ab
inoc 2+ Pch	48,9 ± 11,8 ab	45 ± 11,2 a
Témoin	0 ± 0 e	0 ± 0 c
<i>56 jpi</i>		
Inoc1 + Pch	12,8 ± 5,5 e	18,3 ± 4,3 b
inoc 2+ Pch	36,7 ± 11,2 cd	22,2 ± 5,7 b
Témoin	0 ± 0 f	0 ± 0 c
<i>114 jpi</i>		
Inoc1 + Pch	25 ± 10,8 d	27,8 ± 9,1 b
inoc 2+ Pch	53,9 ± 8,9 a	49,4 ± 1,83 a
Témoin	0 ± 0 f	0 ± 0 c

Le jour de l'inoculation de *P. chlamydospora* au niveau du tronc (0 jpi), 30% des racines étaient colonisées par *P. oligandrum* lorsque l'inoculum n°1 avait été employé et 45% avec l'inoculum n°2. Les taux de colonisation étaient globalement constants au cours du temps, avec des niveaux inférieurs pour l'inoculum n°1 à celui de l'inoculum n°2. Lorsque la moyenne des taux de colonisation mesurée au cours des 4 mois est comparée entre les échantillons, il apparaît que l'inoculum n°1 est globalement moins bien implanté que le deuxième (tableau 5). En 2010 et 2011, les taux de colonisation racinaire étaient respectivement de 24,2 et 28,2% pour le premier inoculum. Celui de l'inoculum n°2 était supérieur, avec respectivement 45% et 38% des racines colonisées en 2010 et 2011.

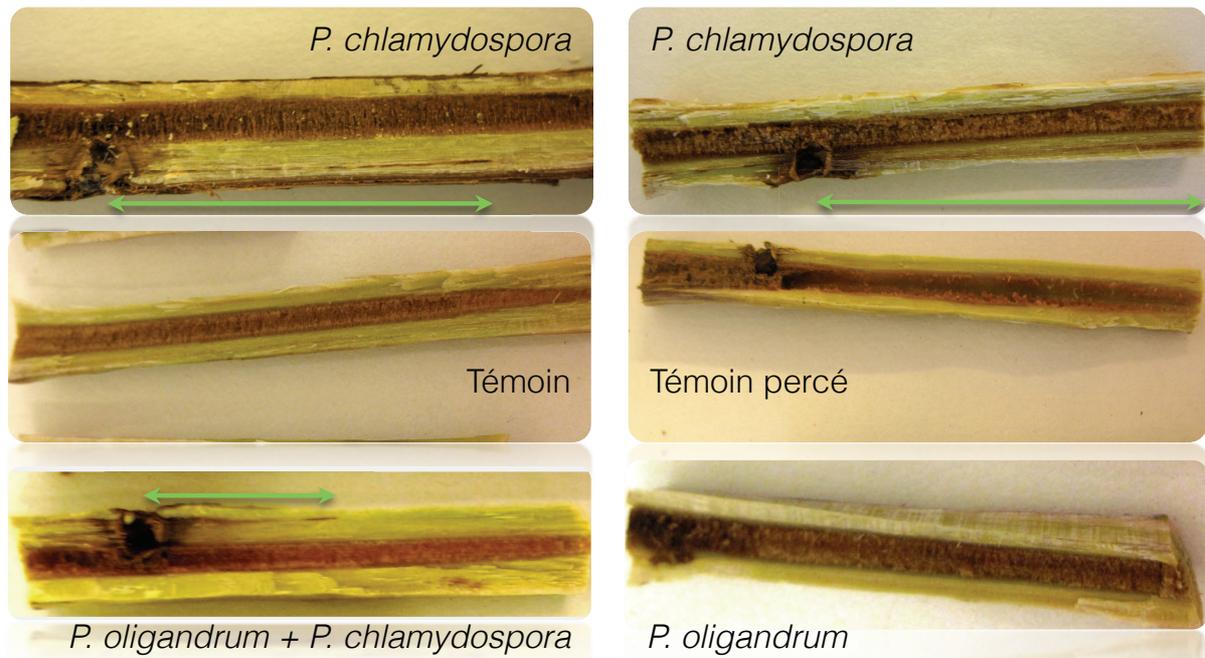
Tableau 5 Présence de *P. oligandrum* au niveau des racines de Cabernet Sauvignon durant une période de 4 mois. Les valeurs reportées sont les moyennes (en %)  $\pm$  Erreur Standard de 45 plants échantillonnés (20 racines par plant). Les moyennes avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à  $p < 0,05$  (ANOVA), inoc1 ou 2 + Pch= inoculum n° 1 ou 2 de *P. oligandrum*, Pch = *P. chlamydospora*.

Traitement	Colonisation racinaire (%)	
	2010	2011
Inoc1 + Pch	24,2 $\pm$ 3,9 a	28,2 $\pm$ 4,6 a
Inoc2 + Pch	45,1 $\pm$ 4,8 b	37,9 $\pm$ 4,8 a
Témoin	0,2 $\pm$ 0,2 c	0 $\pm$ 0 b

## 2. Protection par *P. oligandrum* des plants de vigne contre une attaque de *P. chlamydospora*

La taille des nécroses générées par *P. chlamydospora* dans le tronc des boutures de Cabernet Sauvignon a été mesurée afin d'évaluer la capacité de *P. oligandrum* à induire une protection du bois de la vigne. La figure 2 montre un exemple d'observation réalisée.

Chez les plants témoins non percés, chez ceux percés au niveau du tronc et ceux traités uniquement avec *P. oligandrum* (inoc 1 et 2), aucune nécrose n'a été détectée en 2010 et en 2011 (figure 3). Les plants traités par *P. chlamydospora* ont montré des taux de nécroses supérieurs à 80% en moyenne pour les deux années. En comparaison, chez les plants colonisés au niveau de la rhizosphère par *P. oligandrum* (inoculum n°1 et n°2), le niveau de nécroses a été environ 2 fois inférieur en 2010, cette différence étant statistiquement significative selon l'analyse de variance (ANOVA,  $p < 2,2 \times 10^{-16}$ , figure 3). La réduction de nécroses n'a pas été différente entre les deux inocula. En 2011 le même constat a été réalisé avec une réduction du taux d'attaque par *P. chlamydospora* d'environ 30% pour les plants traités avec les inocula 1 ou 2 par rapport aux plants non traités ( $p < 2,2 \times 10^{-16}$ ).



Photographie 1 Exemples de nécroses observées sur des boutures de Carbernet Sauvignon 114 jours après l'inoculation par *P. chlamydospora*. A partir du trou, apparait une décoloration plus ou moins orange-foncée qui tend vers le marron (traits verts), comparable au premier stade de dégradation du bois avant la formation d'une nécrose plus importante. Elle progresse longitudinalement sur la longueur de la bouture (*P. chlamydospora*), cette nécrose est réduite ave *P. oligandrum* + *P. chlamydospora*, les témoins ne présentent aucune nécrose similaire.

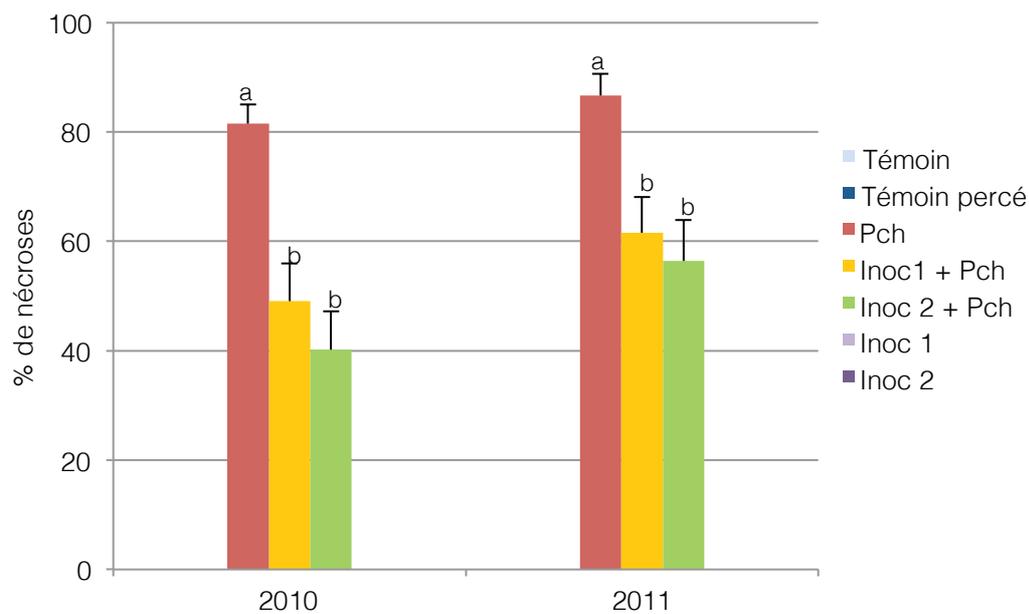
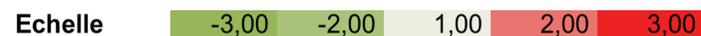


Figure 3 Evaluation des nécroses dans le tronc des boutures de Cabernet Sauvignon. Les valeurs reportées sont les moyennes des taux de nécroses (en %) mesurés chez 30 plants par modalité et prélevés 114 jours après infection par *P. chlamydospora*. Les barres avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes à  $p > 0,05$  (ANOVA).

	0 jpi				7 jpi				14 jpi			
	Po	Pch	Po+Pch	Percé	Po	Pch	Po+Pch	Percé	Po	Pch	Po+Pch	Percé
<b>Protéines PR</b>												
PR1				-1,01		-8,05				-8,05		
PR10		4,57		2,13		1,77	2,38			1,77	2,38	
CHIT3		14,09	7,47	10,10	-3,45		8,43		-3,45		8,43	
CHIT4	-5,76	5,16	4,58	-4,03		3,71	5,88	2,66		3,71	5,88	2,66
PGIP	-2,29	2,29	1,82	3,55			2,43	2,39			2,43	2,39
GLU	-19,46	5,74	4,02	7,88			2,61	3,95			2,61	3,95
PIN	-6,19		-5,48	-2,24		5,80	1,92	4,13		5,80	1,92	4,13
<b>Phénylpropanoïdes</b>												
PAL		3,78	2,51	5,53				1,34				1,34
STS	-2,74	14,85	6,91	16,96			1,87				1,87	
CHI	-2,22		-1,54	1,27								
CHS	-2,41			-2,59			1,69				1,69	
LDOX	-2,82	-4,13	-2,91	-1,50	-1,40	-2,57	1,84		-1,40	-2,57	1,84	
BAN	-2,03	-1,55	-1,90	1,30		-2,35	1,54			-2,35	1,54	
<b>Indoles</b>												
ANTS		4,36	1,71	4,00	1,63	-2,02	1,61		1,63	-2,02	1,61	
CHORM		2,88	1,90	1,31	-1,37		1,46		-1,37		1,46	
CHORS		6,13		3,39	1,35		1,90		1,35		1,90	
<b>Paroi</b>												
CALS	-1,15	4,67		4,37	-1,45	1,77	1,87	1,58	-1,45	1,77	1,87	1,58
PER	-1,57			-2,85	1,58		2,08	1,86	1,58		2,08	1,86
CAGT	-2,96	6,10	5,00	3,12	1,35		2,86		1,35		2,86	
<b>Divers</b>												
LOX				-1,49	-1,27	-4,58	1,23		-1,27	-4,58	1,23	
GST	-3,50	2,88		1,86			2,45				2,45	
ACC	1,73	2,57		2,97		1,59	3,83			1,59	3,83	

Tableau 6 Niveaux d'expression relatifs des gènes chez les plants de vigne inoculés avec différentes modalités : Plants inoculés avec *P. oligandrum* (Po), plants infectés par *P. chlamydospora* (Pch), plants inoculés par *P. oligandrum* et attaqués par Pch (Po+Pch) et plants percés au niveau du tronc (percés). Les expressions relatives sont calculées par rapport aux témoins non inoculés et non percés sur les trois temps de prélèvement (0 jpi correspond à 2 heures après inoculation, 7 et 14 jpi=jours post inoculation). Lorsque les niveaux d'expression sont significatifs, la valeur est mentionnée (Kruskall-Wallis à  $p < 0,05$ ).



### 3. Caractérisation des réponses de défense de la plante par PCR quantitative

#### 3.1 Analyse générale de l'expression des gènes de défense de la vigne

Dans un premier temps, les expressions relatives des gènes ont été calculées pour les différentes modalités par rapport aux témoins non inoculés par *P. oligandrum* et non infectés par *P. chlamydospora* (tableau 6).

Globalement, entre 0 et 14 jours après inoculation (jpi) par *P. chlamydospora*, le niveau d'expression des gènes est différent selon les modalités. Pour la modalité *P. oligandrum* seul, les gènes sont relativement stables avec une légère tendance à la répression. A l'inverse, le perçage du tronc (modalité « Percés ») a induit un stress important caractérisé par une surexpression des gènes de défense à 0 jpi, soit 2 heures après perçage du tronc, les modalités *P. chlamydospora*, *P. oligandrum* + *P. chlamydospora* et « Percés » étant peu différentes. L'effet perçage ayant donc induit un effet non négligeable sur l'expression des gènes, l'analyse de chaque modalité a été réalisée plus finement par rapport à son témoin correspondant (tableau 7) :

Tableau 7 Synthèse des différentes comparaisons réalisées pour l'étude de l'interaction *P. oligandrum* / plante / *P. chlamydospora*.

Modalités	Référence	Effet étudié
Percés	Témoins non inoculés et non percés	Perçage
<i>P. chlamydospora</i>	Témoins non inoculés et percés	<i>P. chlamydospora</i>
<i>P. oligandrum</i>	Témoin non inoculés et non percés	<i>P. oligandrum</i>
<i>P. oligandrum</i> + <i>P. chlamydospora</i>	Témoins inoculés par <i>P. chlamydospora</i> et percés	Effet de <i>P. oligandrum</i> en présence de <i>P. chlamydospora</i>

#### 3.2 Analyse de l'expression des gènes suite au « perçage » du tronc

Pour évaluer l'effet du perçage du tronc, le niveau d'expression relatif des gènes étudiés a été calculé par rapport aux plants témoins non inoculés par un micro-organisme (*P. chlamydospora* et/ou *P. oligandrum*) et non percés. Le tableau 8 montre que le perçage cause un stress mécanique chez la plante, il se traduit par une surexpression de 12 gènes de défense de la plante à 0 jpi. Ils appartiennent à chacune des 5 familles de gènes étudiées. L'effet du stress diminue au cours du temps pour tous ces gènes, sauf pour CHIT3.

Tableau 8 Niveaux d'expression relatifs des gènes chez les plants de vigne percés au niveau du tronc par rapport aux témoins non percés et non inoculés par un micro-organisme (*P. chlamydospora* et/ou *P. oligandrum*) pour les 3 temps de prélèvements (0 jpi soit 2 heures après inoculation, 7 et 14 jpi= jours post inoculation). Lorsque les niveaux d'expression sont significatifs, la valeur est mentionnée (Kruskall-Wallis à  $p < 0,05$ ).

		0 jpi	7 jpi	14 jpi
Protéines PR	PR1	-1,01		
	PR10	2,13		-2,30
	CHIT3	10,10		
	CHIT4	-4,03	2,66	-1,85
	PGIP	3,55	2,39	
	GLU	7,88	3,95	-1,62
	PIN	-2,24	4,13	-2,78
	Phénylpropanoïdes	PAL	5,53	1,34
STS		16,96		-2,42
CHI		1,27		
CHS		-2,59		
LDOX		-1,50		
BAN		1,30		
Indoles		ANTS	4,00	
	CHORM	1,31		
	CHORS	3,39		
Paroi	CALS	4,37	1,58	
	PER	-2,85	1,86	-2,05
	CAGT	3,12		
Divers	LOX	-1,49		
	GST	1,86		-3,51
	ACC	2,97		

A 0 jpi, la famille de gènes qui répond le plus est celle des protéines PR (7 gènes suivis). Les gènes PR10, CHIT3, PGIP et GLU sont surexprimés, tandis que le CHIT4 et le PIN sont réprimés. Cette tendance à la surexpression est retrouvée significativement à 7 jours pour la GLU, la PGIP, CHIT3, CHIT4 et PIN. Les valeurs baissent fortement à 14 jours, puisqu'à l'exception de la CHIT3 qui est surexprimée, 5 gènes sur 7 codant pour les protéines PR sont réprimés.

Concernant l'expression des gènes codant pour la voie des indoles et pour des protéines pariétales, une même tendance semble se mettre en place. Il y a souvent une forte expression des gènes à 0 jpi (sauf pour PER), puis elle s'atténue au fur et à mesure du temps. Les valeurs les plus basses étant obtenues à 14 jpi.

Une expression différentielle au cours du temps est observée pour les 6 gènes codant pour les phénylpropanoïdes, la PAL et la STS ont une surexpression à 0 jpi, ces valeurs baissent à 7 jpi puis un faible état de répression est observé à 14 jpi. L'expression de la CHI est stable pour les 3 temps considérés. Les autres gènes ont, soit une faible

répression (CHS, LDOX), soit une faible expression (BAN) à 0 jpi. Cette expression augmente à 7 jpi puis à 14 jpi.

La LOX n'est pas activée à 0 jpi, elle l'est à un niveau très bas à 7 jpi et 14 jpi. Le gène impliqué dans la voie de synthèse de l'éthylène (ACC) répond à 0 jpi (+2,97), son expression se stabilise par la suite.

### **3.3 Analyse de l'expression des gènes après infection du tronc par *P. chlamydospora***

Les réponses de défense de la vigne suite à l'infection par l'agent pathogène *P. chlamydospora* ont été étudiées en prenant comme référence les plants percés, non inoculés par *P. oligandrum*, afin de soustraire « l'effet perçage » des résultats. Le tableau 9 montre que, pour les gènes codant pour les protéines PR, 2 heures après l'inoculation par *P. chlamydospora* (0 jpi), seul le gène codant pour la CHIT4 est très fortement exprimé (+20,77).

Quatre autres gènes (PR1, PR10, CHIT3 et PIN) sont également surexprimés, mais dans une moindre mesure. Sept jours après infection par *P. chlamydospora*, à l'exception du gène CHIT3 dont l'expression est stable, les autres gènes sont faiblement réprimés (PR1, PGIP, GLU) ou montrent une faible expression (PR10, CHIT4). Quatorze jours après inoculation par *P. chlamydospora*, les 7 gènes codant pour les protéines PR montrent une surexpression significative. Concernant les 6 gènes impliqués dans la voie des phénylpropanoïdes, ils sont soit peu ou pas exprimés à 0 jpi, à l'exception de CHS. A 7 jpi, tous ces gènes sont réprimés et à 14 jpi, seule la STS (+3,93) est surexprimée et dans une moindre mesure la CHI et la LDOX.

Deux gènes codant pour la voie des indoles sont faiblement activés à 0 jpi (ANTS et CHORS), la CHORM (+2,20) est plus fortement exprimée, puis ils sont réprimés à 7 jpi et 14 jpi. Deux des 3 gènes étudiés et codant pour les protéines de la paroi sont activés à 0 jpi (PER et CAGT). Ces 3 gènes sont réprimés à 7 jpi et faiblement exprimés à 14 jpi. Le gène impliqué dans la voie de synthèse des oxylipines (LOX) passe d'un état réprimé (-2,6), à 7 jpi, à un état de surexpression à 14 jpi (+5,64). La même tendance s'observe pour l'enzyme de détoxification (GST) qui est fortement activée à 14 jpi. La voie de l'éthylène est inactive (ACC) sur les 3 temps de prélèvement.

Tableau 9 Niveaux d'expression relatifs des gènes chez les plants de vignes inoculés avec *P. chlamydozpora* par rapport aux témoins percés non inoculés par le pathogène, pour les 3 temps de prélèvement (0 jpi soit 2 heures après inoculation, 7 et 14 jpi= jours post inoculation). Lorsque les niveaux d'expression sont significatifs, la valeur est mentionnée (Kruskall-Wallis à  $p < 0,05$ ).

		0 jpi	7 jpi	14 jpi
Protéines PR	PR1			2,09
	PR10	2,15	1,18	4,13
	CHIT3	1,40	1,40	3,29
	CHIT4	20,77		7,25
	PGIP			1,69
	GLU	-1,37		1,79
	PIN			3,15
	Phénylpropanoïdes	PAL	-1,46	-2,32
STS				3,93
CHI			-1,93	1,36
CHS			-2,12	-1,29
LDOX		-2,76	-2,00	1,54
BAN		-2,01	-2,28	-1,43
Indoles		ANTS		-2,37
	CHORM	2,20	-2,07	-1,77
	CHORS		-2,73	-1,97
Paroi	CALS			
	PER			1,59
	CAGT	1,96	-1,94	
Divers	LOX		-2,61	5,64
	GST	1,55		3,23
	ACC			-1,80

### 3.4 Analyse de l'expression des gènes après inoculation des racines par *P. oligandrum*

Suite à l'introduction de *P. oligandrum* au niveau du système racinaire de la plante 7 jours avant l'inoculation par *P. chlamydozpora* (soit 0 jpi), le niveau d'expression relatif a été calculé par rapport aux témoins non inoculés et non percés. D'une façon générale, l'expression des 22 gènes étudiés est faible (tableau 10).

Concernant les protéines PR, la tendance à la répression est présente pour les 3 temps de prélèvements. La répression est plus forte à 0 jpi qu'à 7 jpi (où seule la CHIT3 est significativement réprimée) et 14 jpi (où la GLU, CHIT4 et la PIN sont réprimées significativement).

Les gènes impliqués dans la voie des phénylpropanoïdes et dans la formation de la paroi sont réprimés à 0 jpi (de -1,15 à -2,96), ils se stabilisent à 7 jpi puis ils sont de nouveau légèrement réprimés à 14 jpi, sauf pour la LDOX (+2,08).

Les gènes impliqués dans la voie de la synthèse des indoles ne sont pas ou peu stimulés pour les 3 temps de prélèvement, les niveaux d'expression oscillent entre -1,65 et 1,63.

Le gène LOX est uniquement exprimé à 14 jpi, alors que celui de l'ACC est très faiblement exprimé quels que soient les temps considérés. La GST est significativement réprimée à 0 jpi et 14 jpi.

Tableau 10 Niveaux d'expression relatifs des gènes chez les plants de vigne inoculés avec *P. oligandrum*, par rapport aux plants non inoculés non percés, pour les trois temps de prélèvement (0 jpi soit 2 heures après inoculation, 7 et 14 jpi= jours post inoculation). Lorsque les niveaux d'expression sont significatifs, la valeur est mentionnée (Kruskall-Wallis à  $p < 0,05$ ).

		0 jpi	7 jpi	14 jpi
Protéines PR	PR1			
	PR10			
	CHIT3		-3,45	
	CHIT4	-5,76		
	PGIP	-2,29		
	GLU	-19,46		-2,82
	PIN	-6,19		-2,58
	Phénylpropanoïdes	PAL		
STS		-2,74		-2,21
CHI		-2,22		
CHS		-2,41		-1,78
LDOX		-2,82	-1,40	2,08
BAN		-2,03		
Indoles	ANTS		1,63	
	CHORM		-1,37	-1,65
	CHORS		1,35	
Paroi	CALS	-1,15	-1,45	-1,89
	PER	-1,57	1,58	
	CAGT	-2,96	1,35	-3,28
Divers	LOX		-1,27	
	GST	-3,50		-2,22
	ACC	1,73		

### 3.5 Analyse de l'expression des gènes après inoculation des racines par *P. oligandrum* puis des troncs par *P. chlamydospora*

Afin de comprendre le rôle de *P. oligandrum* dans l'expression des gènes de défense de la plante lorsqu'elle est infectée par *P. chlamydospora*, les expressions relatives des gènes des plants de la modalité *P. oligandrum* + *P. chlamydospora* ont été calculées par rapport aux plants infectés seulement par *P. chlamydospora* (tableau 11). A 0 jpi, les gènes

codant pour la LDOX et la LOX sont les 2 seuls légèrement surexprimés, la plupart des autres gènes, 17 sur 20, sont faiblement réprimés à 0 jpi puis fortement surexprimés à 7 jpi. Les 6 gènes codant pour la voie des phénylpropanoïdes, les 3 de la voie des indoles, la LOX, l'AAC et le GST ainsi que 2 gènes impliqués dans la formation de la paroi (CALs et surtout PER) sont très fortement surexprimés à 7 jpi. Lors de ce prélèvement (7 jpi), cette surexpression est moins marquée chez les gènes codant pour les protéines PR, à l'exception de la GLU et de la PR1. Il est intéressant de noter que ces gènes (protéines PR) sont généralement les moins stimulés pour les 3 dates de prélèvement, la PIN est même constamment réprimée.

Tableau 11 Niveaux d'expression relatifs des gènes chez les plants de vigne inoculés avec *P. oligandrum* et infectés par *P. chlamydospora*, par rapport aux plants infectés seulement par *P. chlamydospora*, pour les trois temps de prélèvement (0 jpi soit 2 heures après inoculation, 7 et 14 jpi= jours post inoculation). Lorsque les niveaux d'expression sont significatifs, la valeur est mentionnée (Kruskall-Wallis à  $p < 0,05$ ).

		0 jpi	7 jpi	14 jpi
Protéines PR	PR1	-2,07	5,23	
	PR10	-3,54		-1,98
	CHIT3	-1,86		
	CHIT4			1,13
	PGIP			
	GLU		3,68	
	PIN	-5,05		-1,73
Phénylpropanoïdes	PAL		6,51	
	STS	-1,99	4,40	-1,45
	CHI	-2,23		
	CHS		15,74	1,81
	LDOX	2,07	7,04	
	BAN		3,99	-2,84
Indoles	ANTS	-2,39	3,23	1,37
	CHORM		5,33	1,75
	CHORS	-4,48	8,37	2,36
Paroi	CALS		1,84	4,98
	PER		11,90	2,50
	CAGT	-2,89		1,47
Divers	LOX	2,38	8,46	
	GST	-1,96	3,22	
	ACC	-2,73	2,84	2,41

La forte stimulation des gènes observée se poursuit à 14 jpi uniquement pour les gènes impliqués dans le renforcement de la paroi (CAL5, PER et CAGT), dans la voie des indoles (ANTS, CHORM et CHORS) et la voie de l'éthylène (ACC).

D'une façon globale, les 2 gènes les plus fortement surexprimés sont obtenus à 7 jours avec celui codant pour la CHS (+15,74), impliqué dans la voie des flavonoïdes, et celui codant pour la PER (+11,9), impliqué dans le processus de lignification des parois. La LOX est stimulée à T0 avec un pic à 7 jours puis revient à un niveau plus faible à 14 jours, tandis que le gène de l'ACC commence à être stimulé à 7 et 14 jours.

#### **4. Etude transcriptomique de l'interaction tripartite plante / *P. oligandrum* / *P. chlamydospora***

Les modifications transcriptionnelles chez *Vitis vinifera*, en réponse aux inoculations par *P. oligandrum* au niveau des racines et *P. chlamydospora* dans le tronc, ont été étudiées par analyse microarrays. De manière similaire aux analyses effectuées sur les racines dans le chapitre précédent, l'étude a été effectuée sur les échantillons prélevés en 2010, 0 et 14 jours après inoculation avec l'inoculum n°2 de *P. oligandrum*.

Les résultats sont présentés en 3 parties : (1) une analyse globale des gènes significativement modulés au cours du temps (de 7 à 21 jours) selon chaque traitement est d'abord réalisée. (2) Puis les catégories de gènes spécifiquement modifiées sont décrites pour les traitements avec *P. oligandrum* seul, avec *P. chlamydospora* seul et lorsque *P. oligandrum* et *P. chlamydospora* sont appliqués sur les plants. (3) Une analyse plus fine du niveau de la régulation des différents transcrits et des gènes communs aux traitements : *P. chlamydospora* et *P. oligandrum* + *P. chlamydospora* est réalisée.

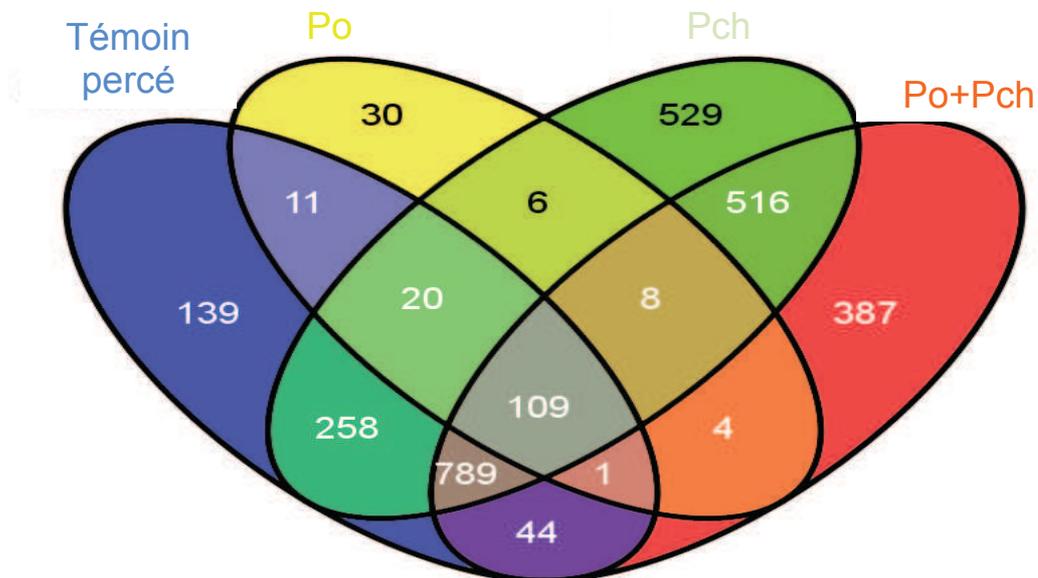


Figure 4 Diagramme de Venn représentant les gènes différentiellement exprimés au cours du temps selon le traitement ( $p < 0,01$  test statistique de Limma) (0 et 14 jours post- inoculation), Po = *P. oligandrum*, Pch= *P. chlamydospora*.

#### 4.1 Les changements globaux

Suite aux différents traitements, et selon les différentes modalités, un grand nombre de gènes du tronc (5653 au total) présentent un changement significatif au niveau de leur expression. Le diagramme de Venn (figure 4) permet de déterminer les gènes spécifiques et communs à chaque traitement.

Les témoins percés au niveau du tronc montre des variations dans l'expression des gènes, 139 sont spécifiques à ce traitement et 1232 sont communs à d'autres modalités. *P. oligandrum* modifie l'expression de 189 gènes, 30 lui sont spécifiques. Le traitement avec *P. chlamydospora* induit le plus grand nombre de modulations avec un total de 2235 gènes différentiellement exprimés, la modalité *P. oligandrum* + *P. chlamydospora* est associée avec une expression différentielle de 1858 gènes. Les gènes spécifiques de *P. chlamydospora* et *P. oligandrum* + *P. chlamydospora*, sont respectivement au nombre de 529 et 387. Cent neuf gènes sont communs à tous les traitements.

Pour étudier l'interaction entre la plante, *P. oligandrum* et *P. chlamydospora*, nous nous sommes concentrés sur les gènes spécifiques à chaque traitement. Ainsi les 529, 30 et 387 gènes spécifiques respectivement des traitements avec *P. chlamydospora*, *P. oligandrum* et *P. oligandrum* + *P. chlamydospora* sont analysés ci-après.

#### 4.2 Etude des modifications transcriptionnelles induites par l'agent pathogène *P. chlamydospora* au niveau du tronc

Le logiciel d'analyse MapMan (version 10) permet de classer les gènes différentiellement exprimés selon les différentes catégories fonctionnelles auxquels ils appartiennent. Le tableau 12 présente les catégories qui ont été significativement modifiées au cours du temps (de 0 à 14 jours après inoculation par *P. chlamydospora*).

Tableau 12 Catégories fonctionnelles différentiellement exprimées au cours du temps pour les 529 gènes spécifiques de l'interaction *V. vinifera* / *P. chlamydospora* et statistiquement significativement exprimés selon le test des rangs de Wilcoxon à  $p < 0,05$ . Les résultats sont extraits de l'ontologie génétique de MapMan montrant le nombre de gènes annotés pour chaque processus ou famille de protéines.

Bin	Catégorie fonctionnelle	Nombre de gènes sous / sur-exprimés	p-value
31	cell		
31.1	cell.organisation	1/18	$3,98 \times 10^{-2}$
11	lipid metabolism		
11.3	lipid metabolism.Phospholipid synthesis	0/4	$1,81 \times 10^{-2}$
27	RNA		
27.3	RNA.regulation of transcription		
27.3.67	RNA.regulation of transcription.putative transcription regulator	0/4	$2,90 \times 10^{-2}$
10.2	cell wall.cellulose synthesis		
10.2.1	cell wall.cellulose synthesis.cellulose synthase	3/1	$1,42 \times 10^{-2}$
26.21	misc.protease inhibitor_seed storage_lipid transfer protein (LTP) family protein	0/5	$1,51 \times 10^{-2}$
30.2.8	signalling.receptor kinases.leucine rich repeat VIII		
30.2.8.2	signalling.receptor kinases.leucine rich repeat VIII.2	2/0	$1,88 \times 10^{-2}$
17.2.3	hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated	4/1	$1,97 \times 10^{-2}$
21.3	redox.heme	2/0	$2,58 \times 10^{-2}$
20.2	stress.abiotic	3/2	$3,61 \times 10^{-2}$

Neuf catégories fonctionnelles sont significativement modulées par *P. chlamydospora* : 4 sont exclusivement stimulées (31.1, 11.3, 27.3.67, 26.21) et 4 sont exclusivement réprimées (10.2.1, 30.2.8.2, 17.2.3, 21.3), la catégorie stress abiotique (20.2) possède 3 transcrits surexprimés alors que 2 sont réprimés. Les catégories réprimées

concernent 3 transcrits codant pour la synthèse de cellulose au niveau des parois cellulaires, 2 codant pour des récepteurs kinases de type LRR VIII (Leucine Rich Repeat), 4 pour le métabolisme hormonal (celui de la voie des auxines), et 2 pour les hémoprotéines. Les catégories surexprimées concernent 18 transcrits impliqués dans l'organisation cellulaire, 4 transcrits dans le métabolisme des lipides, plus précisément dans la synthèse de phospholipides, 4 transcrits dans la régulation de l'ARN et 5 transcrits associés à la famille des LTP (Lipid Transfert Protein). Plus les probabilités sont fortes, plus les modifications dans la catégorie sont importantes. Les 2 catégories les plus fortement modulées concernent la synthèse de cellulose et la stimulation des LTP ; elles ont les probabilités les plus importantes, respectivement  $1,42 \times 10^{-2}$  et  $1,51 \times 10^{-2}$ . Les 2 catégories les moins altérées sont le stress abiotique et l'organisation cellulaire avec respectivement des probabilités de  $3,61 \times 10^{-2}$  et  $3,98 \times 10^{-2}$ .

#### 4.2.1 Surexpression des gènes impliqués dans l'organisation cellulaire

La catégorie de gènes associés à l'organisation cellulaire est indiquée dans le tableau 13, leurs expressions sont statistiquement significativement modifiées. Trois transcrits ont un niveau d'expression supérieur à 2, ils codent pour une « kinesin-like protein ». Sur les 20 transcrits, un seul est réprimé à un niveau de -1,22, il code pour une « Ankyrin like protein ». Les transcrits sont principalement associés à des gènes codant pour des kinesines (14 transcrits), des tubulines (2 transcrits) et des actines (2 transcrits).

#### 4.2.2 Catégories fonctionnelles induites par *P. chlamydospora*

Trois catégories fonctionnelles sont exclusivement stimulées au cours du temps après traitement par l'agent pathogène, *P. chlamydospora* (tableau 14). Concernant la catégorie dédiée à la régulation de l'ARN, 4 transcrits sont induits à des niveaux variant de 1,35 à 1,79. Trois transcrits codent pour le même gène, une DNA-binding-protein-like, le dernier transcrit code pour une protéine de déméthylation de l'ADN. Au niveau du métabolisme des lipides, la synthèse des phospholipides est stimulée via 4 transcrits, 2 codant pour une « Glycerol-3-phosphate acyltransferase 6 » à des niveaux d'expression supérieurs à 2, les deux autres transcrits ont un niveau d'induction inférieur à 1,8. Les gènes de la famille des LTP ont un niveau de surexpression de 1,13 à 2,66. Le transcrit le plus fortement induit code pour une « Arachidonic acid-induced DEA1 », le plus faiblement induit pour une « Gcap1 protein ».

Tableau 13 Principaux gènes impliqués dans l'organisation cellulaire différemment exprimés au cours du temps (de 0 à 14 jours) pour les plants traités avec *P. chlamydospora*. Niveaux d'expression exprimés en log 2, l'expression des gènes est significativement différente selon le test statistique Limma à  $p < 0,01$ .

Nom du gène	Description	Niveau d'expression
chr3_jgvv63_103_t01	Kinesin-like protein	2,55
chr5_jgvv20_55_t01	Kinesin-like protein	2,26
chr8_jgvv40_75_t01	Kinesin-like protein	2,25
chr18_jgvv1_466_t01	Kinesin-like protein	1,75
chr7_jgvv31_12_t01	Kinesin-like protein	1,61
chr8_jgvv7_209_t01	Kinesin-like protein	1,53
chr19_jgvv15_109_t01	Kinesin-like protein	1,43
chr8_jgvv7_347_t01	Kinesin-like protein	1,43
chr18_jgvv1_676_t01	Kinesin-like protein	1,39
chr3_jgvv38_389_t01	Kinesin-like protein	1,38
chr14_jgvv30_85_t01	Kinesin-like protein	1,27
chr2_jgvv25_321_t01	Kinesin-like protein	1,10
chr15_jgvv46_217_t01	Kinesin-like protein	1,04
chr15_jgvv48_212_t01	Kinesin-like protein	1,02
chr14_jgvv108_43_t01	Tubulin	1,01
chr8_jgvv7_237_t01	Actin	1,00
chr5_jgvv49_153_t01	Actin related protein	0,98
chr8_jgvv7_697_t01	Tubulin beta-2 chain (Beta-2 tubulin)	0,62
chr11_jgvv16_138_t01	Ankyrin like Protein	-1,22

Tableau 14 Gènes impliqués dans les catégories fonctionnelles significativement et exclusivement surexprimées au cours du temps (de 0 à 14 jours) pour les plants traités avec *P. chlamydospora*. Niveaux d'expression exprimés en log 2, l'expression des gènes est significativement différente selon le test statistique Limma à  $p < 0,01$ .

Catégorie et gène	Description	Niveau d'expression
RNA.regulation of transcription.putative transcription regulator		
<i>chr15_jgvv45_82_t01</i>	DNA-binding protein-like	1,83
<i>chr13_jgvv19_337_t01</i>	protein F16A14.2 (direct DNA methylation)	1,79
<i>chr2_jgvv12_184_t01</i>	DNA-binding protein-like	1,56
<i>chr2_jgvv25_350_t01</i>	DNA-binding protein-like	1,35
lipid metabolism.Phospholipid synthesis		
<i>chr8_jgvv7_663_t01</i>	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 6	2,31
<i>chr13_jgvv19_316_t01</i>	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 6	2,16
<i>chr17_jgvv0_710_t01</i>	Phosphoethanolamine N-methyltransferase	1,73
<i>chr11_jgvv16_455_t01</i>	kinase/ phosphotransferase, alcohol group as acceptor	1,24
misc.protease inhibitor_seed storage_lipid transfer protein (LTP) family protein		
<i>chr2_jgvv154_24_t01</i>	Arachidonic acid-induced DEA1	2,66
<i>chr5_jgvv20_352_t01</i>	not_assigned	1,84
<i>chr12_jgvv55_60_t01</i>	Arachidonic acid-induced DEA1	1,66
<i>chr14_jgvv68_77_t01</i>	Spindle assembly checkpoint kinase (Aurora kinase) ,	1,65
<i>chr5_gsvivt00031677001_t01</i>	Gcap1 protein	1,13

#### 4.2.3 Catégories fonctionnelles significativement réprimées suite à l'infection par *P. chlamydospora*

Le tableau 15 présente les catégories fonctionnelles significativement réprimées suite à l'infection par *P. chlamydospora*. Deux transcrits de la catégorie récepteur kinase de type LRR VIII, codant pour un « Receptor-like serine/threonine kinase », sont réprimés à un niveau inférieur à 2. Parmi les 5 transcrits du métabolisme des auxines, 4 d'entre eux sont réprimés à des niveaux allant de -1,42 à -1,87. Un transcrit codant pour une « Aux/IAA protein » est faiblement surexprimé à 1,20. Dans la catégorie « Redox.heme », deux transcrits codant pour une « Non-symbiotic hemoglobin class 1 » sont respectivement réprimés à -2,14 et -2,05. Trois transcrits appartenant à la catégorie stress abiotique sont réprimés, celui qui l'est le plus fortement code pour une thaumatine. Deux autres transcrits de cette catégorie sont faiblement surexprimés à 0,75 et 1,18. Enfin, la synthèse de cellulose est réprimée. Trois transcrits codant pour une « Cellulose synthase-like protein » sont réprimés à des niveaux de -1,50 à -1,92, un transcrit est exprimé à + 0,71.

#### **4.3 Etude des modifications transcriptionnelles au niveau du tronc suite au traitement des racines par *P. oligandrum***

Peu de gènes sont significativement modulés au cours du temps au niveau du tronc. Parmi les 30 gènes qui sont spécifiques et différentiellement exprimés (annexe 2), l'analyse des catégories ou sous-catégories fonctionnelles auxquelles ces gènes appartiennent indique que celles-ci ne sont pas significativement modifiées. Ces variations sont donc relativement faibles.

Tableau 15 Gènes impliqués dans les catégories fonctionnelles significativement réprimées au cours du temps (de 0 à 14 jours) pour les plants traités avec *P. chlamydospora*. (Niveaux d'expressions exprimés en log 2, l'expression des gènes est significativement différente selon le test statistique Limma à  $p < 0,01$ ).

Catégorie et gène	Description	Niveau expression
signalling.receptor kinases.leucine rich repeat VIII.2		
<i>chr19_gsvivt00014133001_t01</i>	Receptor-like serine/threonine kinase	-2,34
<i>chr10_jgvv3_181_t01</i>	Receptor-like serine/threonine kinase	-2,53
hormone metabolism,auxin,induced-regulated-responsive-activated		
<i>chr5_jgvv20_441_t01</i>	Aux/IAA protein,	1,20
<i>chr2_jgvv154_1_t01</i>	SAUR-like auxin-responsive protein	-1,43
<i>chr11_jgvv16_32_t01</i>	Auxin-regulated protein	-1,45
<i>chr10_jgvv561_2_t01</i>	not_assigned	-1,65
<i>chr10_jgvv586_3_t01</i>	not_assigned	-1,87
redox,heme		
<i>chr3_jgvv63_183_t01</i>	Non-symbiotic hemoglobin class 1	-2,05
<i>chr14_jgvv68_7_t01</i>	not_assigned	-2,14
stress,abiotic		
<i>chr5_jgvv124_44_t01</i>	SAUR-like auxin-responsive protein	1,18
<i>chr1_jgvv26_118_t01</i>	not_assigned	0,75
<i>chr12_jgvv57_8_t01</i>	not_assigned	-1,22
<i>chr3_jgvv38_255_t01</i>	DnaJ-like protein	-1,99
<i>chr2_jgvv25_393_t01</i>	Thaumatococcus	-2,20
cell wall,cellulose synthesis,cellulose synthase		
<i>chr19_jgvv15_67_t01</i>	Cellulose synthase-like protein	-1,92
<i>chr19_jgvv15_69_t01</i>	Cellulose synthase-like protein	-1,62
<i>chr5_jgvv49_1_t01</i>	Cellulose synthase-like protein	-1,50
<i>chr18_jgvv72_82_t01</i>	Cellulose synthase-like protein	0,71

#### 4.4 Etude des modifications transcriptionnelles lors de l'interaction plante / *P. oligandrum* / *P. chlamydospora*

L'analyse des gènes du tronc montre que 8 catégories fonctionnelles sont significativement modifiées chez les plants de vigne traités au niveau racinaire par *P. oligandrum* et infectés par *P. chlamydospora* au niveau du tronc (tableau 16). Certaines catégories sont exclusivement surexprimées, *i.e.* celle de l'éthylène, de la régulation des facteurs de transcriptions (TF) de type AP2/ERF (Ethylene-responsive binding protein) et du transport de molécules. Quatre catégories fonctionnelles sont réprimées, ce sont celles de la signalisation du calcium (à l'exception d'un transcrit), des phenylpropanoïdes, du jasmonate et du métabolisme des carbohydrates (CHO). Dans la catégorie stress biotique et abiotique, 7 gènes sont réprimés et 9 sont stimulés. La catégorie fonctionnelle la plus significativement réprimée est celle de la signalisation du calcium ( $5,89 \times 10^6$ ), la plus fortement stimulée est celle des TF de type MYB ( $2,12 \times 10^2$ ).

Tableau 16 Catégories fonctionnelles différemment exprimées au cours du temps pour les 387 gènes spécifiques de l'interaction *V. vinifera* / *P. oligandrum* + *P. chlamydospora* et statistiquement significativement exprimés selon le test des rangs de Wilcoxon à  $p < 0,05$ . Les résultats sont extraits de l'ontologie génétique de MapMan montrant le nombre de gènes annotés pour chaque processus ou famille de protéines.

Bin	Catégorie fonctionnelle	Nombre de gènes sous / surexprimés	p-value
20	stress		
20.1	stress.biotic	6/5	$3,34 \times 10^{-2}$
20.2	stress.abiotic	1/4	$2,25 \times 10^{-2}$
30	signalling		
30.3	signalling.calcium	20/1	$5,89 \times 10^{-6}$
16.2.1.10	secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.CAD	5/0	$6,77 \times 10^{-3}$
17.5	hormone metabolism.ethylene		
17.5.3	hormone metabolism.ethylene.induced-regulated-responsive-activated	0/3	$3,59 \times 10^{-2}$
17.7	hormone metabolism.jasmonate		
17.7.1	hormone metabolism.jasmonate.synthesis-degradation		
17.7.1.5	hormone metabolism.jasmonate.synthesis-degradation.12-Oxo-PDA-reductase	4/0	$2,08 \times 10^{-2}$
3.1	minor CHO metabolism.raffinose family		
3.1.1	minor CHO metabolism.raffinose family.galactinol synthases		
3.1.1.2	minor CHO metabolism.raffinose family.galactinol synthases.putative	6/0	$4,52 \times 10^{-3}$
27.3.3	RNA.regulation of transcription.AP2_ERE BP, APETALA2_Ethylene-responsive element binding protein family	12/0	$3,44 \times 10^{-3}$
27.3.25	RNA.regulation of transcription.MYB domain transcription factor family	0/4	$2,12 \times 10^{-2}$

34.99      transport.misc      0/3       $4,96 \times 10^{-2}$

#### 4.4.1 Etude de la voie de signalisation du calcium

Le tableau 17 présente les transcrits associés à la voie de signalisation du calcium. A l'exception d'un transcrit fortement surexprimé (+2,9) codant pour une protéine qui se lie à l'ion  $Ca^{2+}$ , les niveaux de répression varient de -0,9 à -3,3. Dix transcrits ont un niveau de répression inférieur à -2. Les principaux transcrits réprimés codent pour une protéine de la famille des « EF hand calcium binding protein ». Quatre transcrits impliquant des « calmodulines » sont également identifiés.

Tableau 17 Principaux gènes de la signalisation du calcium différenciellement exprimés au cours du temps (de 0 à 14 jours) pour les plants traités avec *P. oligandrum* + *P. chlamydospora*. Niveaux d'expression exprimés en log 2, l'expression des gènes est significativement différente selon le test statistique Limma à  $p < 0,01$ .

Gène	Description	Niveau d'expression
<i>chr12_jgvv59_33_t01</i>	EF hand calcium binding protein	-3,31
<i>chr12_jgvv59_32_t01</i>	EF hand calcium binding protein	-3,29
<i>chr12_jgvv59_37_t01</i>	EF hand calcium binding protein	-3,26
<i>chr12_jgvv59_39_t01</i>	EF hand calcium binding protein	-3,16
<i>chr12_jgvv59_30_t01</i>	EF hand calcium binding protein	-3,14
<i>chr12_jgvv59_40_t01</i>	EF hand calcium binding protein	-3,06
<i>chr12_jgvv59_34_t01</i>	EF hand calcium binding protein	-3,01
<i>chr1_jgvv10_229_t01</i>	EF hand calcium binding protein	-2,69
<i>chr1_gsvivt00010384001_t01</i>	EF hand calcium binding protein	-2,62
<i>chr5_jgvv20_395_t01</i>	calcium-transporting ATPase/ calmodulin binding	-2,34
<i>chr5_jgvv20_414_t01</i>	Calmodulin	-1,68
<i>chr18_jgvv122_103_t01</i>	Calcium ion binding	-1,46
<i>chr5_jgvv77_10_t01</i>	calmodulin-like	-1,26
<i>chr11_jgvv206_8_t01</i>	Similarity to calmodulin-binding protein	-1,26
<i>chr10_jgvv3_75_t01</i>	Calcium ion binding	2,92

#### 4.4.2 Etude de l'expression des gènes associés aux stress biotiques et abiotiques

Le tableau 18 présente les gènes associés aux stress biotiques et abiotiques. Dans la catégorie stress biotiques, 5 transcrits sont surexprimés à des niveaux allant de 1,05 à 2,28. Le transcrit le plus stimulé code pour une « hevamine » qui est une protéine ayant une activité lyzosome et chitinase. Des transcrits codant pour des protéines avec un motif LRR sont également induits. Les transcrits réprimés le sont assez faiblement puisque les valeurs varient de -0,86 à -0,96 pour 4 d'entre eux, un transcrit est plus fortement sous-exprimé (-1,73).

Des transcrits de la catégorie stress abiotiques sont surexprimés de 1,42 à 2,02, le plus fortement induit codant pour une « germin like protein 3 ». Un transcrit est réprimé à -1,95, il code pour une « Fiber protein Fb 25 ».

Tableau 18 Principaux gènes des catégories fonctionnelles « stress biotique et abiotique » différemment exprimés au cours du temps (de 0 à 14 jours) pour les plants traités avec *P. oligandrum*+ *P. chlamydospora*. Niveaux d'expression exprimés en log 2, l'expression des gènes est significativement différente selon le test statistique Limma à  $p < 0,01$ .

Nom du gène	Description	Niveau d'expression
Stress.biotique		
<i>chr15_jgvv46_192_t01</i>	Hevamine	2,28
<i>chr9_gsvivt00029611001_t01</i>	HcrVf2 protein (LRR protein)	1,72
<i>chr18_jgvv117_42_t01</i>	TIR-NBS-LRR class disease resistance protein	1,35
<i>chr15_jgvv46_84_t01</i>	not_assigned	1,32
<i>chr6_jgvv4_496_t01</i>	membrane protein Mlo3	1,09
<i>chr10_jgvv3_60_t01</i>	Negative regulator of systemic acquired resistance SNI1	1,05
<i>chr7_jgvv31_217_t01</i>	Phytoalexin-deficient 4-1 protein	-0,86
<i>chr15_jgvv45_66_t01</i>	not_assigned	-0,86
<i>chr10_jgvv71_85_t01</i>	Disease resistance protein-like protein MsR1	-0,96
<i>chr3_jgvv91_107_t01</i>	NtPRp27	-0,96
<i>chr1_jgvv150_44_t01</i>	not_assigned	-1,73
Stress.abiotique		
<i>chr14_jgvv60_1_t01</i>	germin-like protein 3	2,02
<i>chr5_jgvv20_379_t01</i>	Allergen-like protein	1,95
<i>chr12_jgvv28_218_t01</i>	electron transporter/ heat shock protein binding	1,65
<i>chr16_jgvv39_93_t01</i>	Chaperon DnaJ-domain containing protein	1,42
<i>chr1_pdvv10_299_t01</i>	Fiber protein Fb25	-1,95

#### 4.4.3 Etude de l'expression des gènes associés aux métabolismes secondaire et hormonal

Le tableau 19 présente l'expression des gènes associés aux métabolismes secondaire et hormonal. Au niveau du métabolisme secondaire, la voie des phenylpropanoïdes est significativement réprimée. Les transcrits codent pour une « sinapyl alcohol dehydrogenase-like » et leurs niveaux de répression varient de -1,88 à -2,22. Pour le métabolisme hormonal, la voie de l'éthylène est induite par 3 transcrits, 2 d'entre eux codent pour une protéine de la famille des TF du type bHLH110, une « iron/ascorbate-dependent oxidoreductase ».

A l'inverse, la voie du jasmonate est réprimée pour 4 transcrits, les valeurs allant de -1,61 à -2,57. Ces transcrits codent principalement pour une « LEDI-5c protein (lithospermum erythrorhizon dark-inducible proteins) ».

Tableau 19 Principaux gènes associés aux métabolismes secondaire et hormonal différemment exprimés au cours du temps (de 0 à 14 jours) pour les plants traités avec *P. oligandrum* + *P. chlamydospora*. Niveaux d'expression exprimés en log 2, l'expression des gènes est significativement différente selon le test statistique Limma à  $p < 0,01$ .

Nom du gène	Description	Niveau d'expression
secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.CAD		
<i>chr18_jgvv615_2_t01</i>	Sinapyl alcohol dehydrogenase-like protein	-2,22
<i>chr18_jgvv346_12_t01</i>	Sinapyl alcohol dehydrogenase-like protein	-2,21
<i>chr18_gsvivt00006454001_t01</i>	Sinapyl alcohol dehydrogenase-like protein	-2,17
<i>chr18_jgvv218_1_t01</i>	Sinapyl alcohol dehydrogenase-like protein	-2,06
<i>chr18_jgvv346_10_t01</i>	Sinapyl alcohol dehydrogenase-like protein	-1,88
hormone metabolism.ethylene.induced- regulated-responsive-activated		
<i>chr1_jgvv10_146_t01</i>	Transcription factor bHLH110	1,76
<i>chr4_jgvv23_141_t01</i>	Transcription factor bHLH110	1,49
<i>chr18_jgvv521_1_t01</i>	Iron/ascorbate-dependent oxidoreductase	1,05
hormone metabolism.jasmonate.synthesis- degradation.12-Oxo-PDA- reductase		
<i>chr18_jgvv41_29_t01</i>	LEDI-5c (Lithospermum erythrorhizon dark-inducible proteins) protein	-2,57
<i>chr18_jgvv41_16_t01</i>	LEDI-5c (Lithospermum erythrorhizon dark-inducible proteins) protein	-2,27
<i>chr18_jgvv41_35_t01</i>	LEDI-5c (Lithospermum erythrorhizon dark-inducible proteins) protein	-2,12
<i>chr9_jgvv2_89_t01</i>	13-lipoxygenase	-1,61

#### 4.4.4 Etude de l'expression des facteurs de transcription

Le tableau 20 présente les gènes associés aux facteurs de transcription (TF). Parmi eux, la catégorie des AP2/ERF (Ethylene-Responsive element binding protein family) est significativement réprimée, les valeurs étant entre -0,96 et -3,21. Les 2 transcrits les plus fortement réprimés codent pour un facteur de transcription « CBF-like ». Une seconde catégorie de TF est surexprimée, celle de la famille des MYB (myéloblastose), où 6 transcrits ont un niveau d'expression qui varie de 1,16 à 1,53.

Tableau 20 Principaux gènes de la sous-catégorie « régulation de la transcription de l'ARN » différemment exprimés au cours du temps (0 à 14 jours) pour les plants traités avec *P. oligandrum* + *P. chlamydospora*. Niveaux d'expression exprimés en log 2, l'expression des gènes est significativement différente selon le test statistique Limma à  $p < 0,01$ .

Catégorie et gène	Description	Niveau d'expression
RNA.regulation of transcription.AP2/ERF,Ethylene-responsive element binding protein family		
<i>chr16_jgvv100_89_t01</i>	CBF-like transcription factor	-3,21
<i>chr17_jgvv0_217_t01</i>	CBF-like transcription factor, complete	-2,71
<i>chr11_jgvv16_47_t01</i>	not_assigned	-2,67
<i>chr5_jgvv49_47_t01</i>	Ethylene responsive element binding protein C2	-2,33
<i>chr7_jgvv31_64_t01</i>	Ethylene-binding protein-like	-1,98
<i>chr16_jgvv100_88_t01</i>	Ap2/EREBP transcription factor	-1,82
<i>chr16_jgvv13_67_t01</i>	ethylene responsive element binding factor 1	-1,56
<i>chr19_jgvv14_197_t01</i>	Ethylene response factor 3	-1,51
<i>chr15_jgvv21_108_t01</i>	Ethylene responsive element binding protein C2	-1,35
<i>chr18_jgvv1_977_t01</i>	AP2 transcription factor-like protein	-1,25
<i>chr13_jgvv19_168_t01</i>	LIPLESS1	-1,06
<i>chr7_jgvv5_80_t01</i>	ERF-like protein, partial (43%)	-0,96
RNA.regulation of transcription.MYB domain transcription factor family		
<i>chr4_jgvv8_167_t01</i>	MYB-like protein [ <i>Vitis vinifera</i> ]	1,16
<i>chr11_jgvv16_110_t01</i>	MYB-like protein [ <i>Vitis vinifera</i> ]	1,30
<i>chr19_jgvv85_101_t01</i>	MYB-like protein [ <i>Vitis vinifera</i> ]	1,33
<i>chr14_jgvv6_93_t01</i>	MYB-like protein [ <i>Vitis vinifera</i> ]	1,53

#### 4.4.5 Etude de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des carbohydrates et le transport de molécules diverses

Le tableau 21 présente les gènes impliqués dans le métabolisme des carbohydrates et le transport de molécules diverses.

Au niveau du métabolisme des carbohydrates, la voie de biosynthèse du raffinose (saccharide) est réprimée. Les 6 transcrits codant pour une galactinol synthase, qui est une enzyme clé de cette voie sont sous-exprimés à des niveaux allant de -1.61 à -2.48.

Pour le transport des métabolites, 3 transcrits sont surexprimés dans la catégorie « transport.misc » et 2 codent pour une « Transparent Testa 12 ».

Tableau 21 Principaux gènes de la sous-catégorie « régulation de la transcription de l'ARN » différentiellement exprimés au cours du temps (0 à 14 jours) pour les plants traités avec *P. oligandrum* + *P. chlamydospora*. Niveaux d'expression exprimés en log 2, l'expression des gènes est significativement différente selon le test statistique Limma à  $p < 0,01$

Catégorie et gène	Description	Niveau d'expression
minor CHO metabolism.raffinose family		
<i>chr14_jgvv60_183_t01</i>	Galactinol synthase	-2,48
<i>chr14_jgvv60_181_t01</i>	Galactinol synthase	-2,13
<i>chr14_jgvv60_178_t01</i>	Galactinol synthase	-2,12
<i>chr14_jgvv60_180_t01</i>	Galactinol synthase	-2,12
<i>chr14_jgvv60_176_t01</i>	Galactinol synthase	-1,96
<i>chr14_jgvv60_184_t01</i>	Galactinol synthase	-1,61
transport.misc		
<i>chrun_jgvv225_6_t01</i>	Mate efflux domain-containing protein	1,36
<i>chr12_jgvv28_271_t01</i>	Transparent Testa 12	1,41
<i>chr12_jgvv28_270_t01</i>	Transparent Testa 12	1,16

#### 4.5 Validation des microarrays par RT-qPCR

Le figure 6 présente la corrélation obtenue par comparaison des valeurs d'expression entre micro-arrays et RT-PCRq selon différents gènes et pour les modalités témoins percés (B) et *P. oligandrum* + *P. chlamydospora* (A). Les niveaux de corrélation obtenus confirment la relation entre les valeurs du niveau d'expression des gènes ou « Fold change » obtenues avec les deux techniques utilisées.

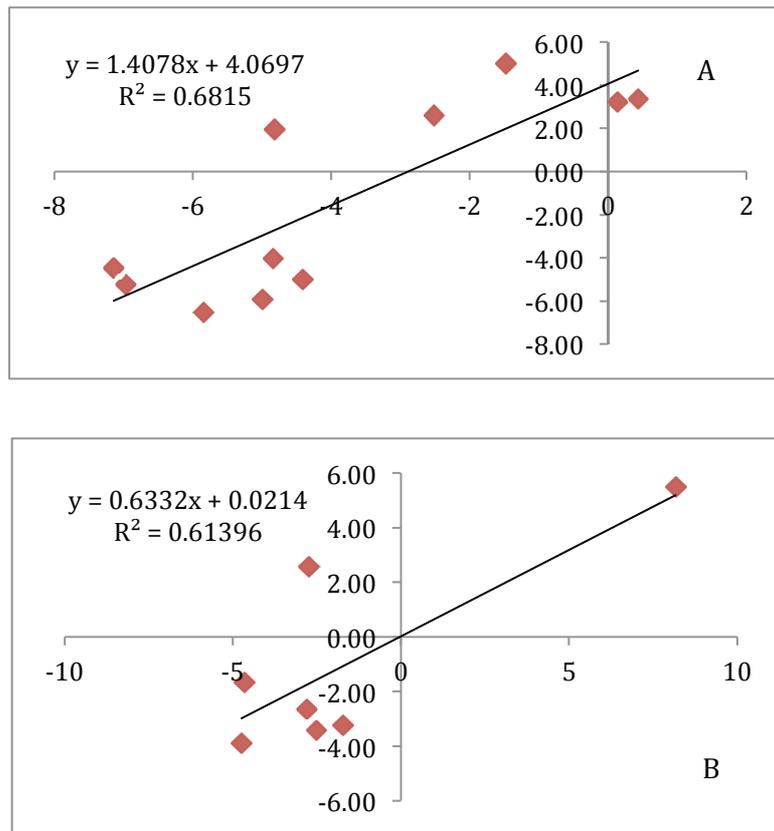


Figure 6 Validation du niveau d'expression des microarrays par qRT-PCR. Correlation en  $\log^2$  des expressions relatives pour les plants traités avec *P. oligandrum* + *P. chlamydospora* (A) et les plants témoins percé (B). Un point (en rouge) représente un gène étudié (ABC transporter, auxin binding protein, cytochrome P450, expansin, GDSL lipase, dioxygenase (gibberelin), glycosyl transferase, auxin responsive protein, naringenin dioxygenase, polygalacturonase, terpene synthase et glycosyl transferase pour la modalité A / ABC transporter, allene oxyde cyclase, cytochrome P450, expansin, dioxygenase (gibberelin), auxin responsive protein, polygalacturonase, phospholipase et glycosyl transferase pour la modalité B). Les valeurs d'expressions relatives obtenues par RT-PCRq sont représentées en abscisse et les valeurs obtenues par microarray en ordonnée.

## Discussion-conclusions

Après avoir montré au chapitre 2 que *P. oligandrum* induit des modifications importantes au niveau du métabolisme racinaire de la plante, nous avons étudié les conséquences de cette interaction en terme de résistance induite chez le végétal lors d'une attaque subséquente par un agent pathogène.

Cet effet indirect de *P. oligandrum* sur la plante a été établi afin de lutter contre *P. chlamydospora*, un champignon impliqué dans l'esca, la principale maladie du bois de la vigne. Au cours d'un essai sous serre sur de jeunes plants de vigne (boutures de Cabernet Sauvignon), deux inocula de *P. oligandrum* ont été utilisés et la persistance, le niveau de colonisation racinaire par l'oomycète ainsi que la résistance induite dans le bois de vigne ont été étudiés. Les résultats montrent que *P. oligandrum* est fréquemment détecté au niveau des racines de Cabernet Sauvignon et persiste au cours du temps (également vu au chapitre 2). Cette colonisation était associée à une réduction de la longueur des nécroses dues à *P. chlamydospora*, de 50% en 2010 et de 36 % en 2011. L'absence de contact entre le pathogène (présent dans le tronc) et l'agent de biocontrôle (colonisant uniquement les racines) indique une action à distance de ce dernier et donc vraisemblablement une stimulation des défenses de la plante. Mohamed *et al.* (2007) ont observé le même type d'effet indirect chez des feuilles de boutures de vigne contre *Botrytis cinerea*, le niveau de protection obtenu avoisinait 75 %.

Pour évaluer la résistance induite chez la vigne par *P. oligandrum* pour lutter contre *P. chlamydospora*, l'expression de 22 gènes impliqués dans le système de défense de la vigne a d'abord été analysé au niveau moléculaire par RT-PCRq selon la méthodologie employée par Dufour *et al.* (2012). Ces gènes ont été sélectionnés car ils appartiennent à des voie métaboliques associées à la défense des végétaux, *i.e.* les protéines PR, la voie des phénylpropanoïdes, des indoles, de l'éthylène, la formation de la paroi végétale...

Cette approche est nouvelle car à notre connaissance, aucune analyse d'expression de gènes n'a été effectuée à partir d'ARN directement extraits du bois de vigne. Ce type d'extraction étant particulièrement difficile car ce bois est riche en carbohydrates, tannins, composés acides et composés phénoliques qui interfèrent avec les réactions enzymatiques et limite l'obtention d'ARN de qualité satisfaisante (Bordiec *et al.* 2010).

Les résultats de RT-qPCR ont montré des niveaux d'expression différents selon que la plante était colonisée par l'agent antagoniste, *P. oligandrum*, le champignon pathogène, *P. chlamydospora*, ou les 2 micro-organismes. La réponse de la vigne à l'attaque par *P.*

*chlamydospora* seul est caractérisée d'abord par une répression des gènes codant pour les PR-protéines, 7 jours après infection, puis par leur stimulation une semaine plus tard (+14 jours). Dans cette interaction les autres familles de gènes étudiées, e.g. phytoalexines et constituants de la paroi, sont réprimées à l'exception des stilbènes. Ces résultats concordent avec les travaux de Bellee (2012), qui ont montré, le même profil de réponse des gènes de défense de la vigne au niveau foliaire, en réponse à une infection par *Botryosphaeriaceae* spp. Les phytoalexines et les gènes de la paroi étaient fortement réprimés, mais les stilbènes et les protéines PR étaient surexprimés. Par ailleurs, ces travaux effectués avec des boutures de Cabernet Sauvignon ont été réalisés avec le même ensemble de gènes que celui utilisé dans notre étude.

Nos résultats diffèrent, pour partie, des travaux réalisés par Rotter *et al.* (2009) à partir de feuilles de vigne, lors de l'étude de l'interaction vigne / *Eutypa lata*. Ils avaient constaté une surexpression de plusieurs protéines PR (CHIT, GLU, PR5, PR1) suite à l'infection de plants de vigne par *E. lata*, mais aussi une surexpression de la PAL ainsi que d'autres protéines de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Il semblerait donc que la réponse de la vigne soit dépendante de l'espèce pathogène considérée, la plante adaptant son système de défense en fonction du pathogène.

Il est important de noter que la méthode d'inoculation de *P. chlamydospora*, i.e. le perçage du tronc, induit un stress abiotique non négligeable chez la plante comme l'indique la surexpression de nombreux gènes des 5 familles de gènes étudiés, 2 heures après le perçage. Les 7 gènes codant pour les protéines PR étudiés dans le cas présent sont en moyenne les plus stimulés. Quelle que soit leur famille, la surexpression de ces gènes s'atténue au fur et à mesure du temps, elle n'est plus observée 14 jours après le perçage du tronc. Globalement, ces résultats montreraient que les protéines PR sont peu spécifiques car elles réagissent aussi bien à un stress abiotique (perçage), que biotique, e.g. *P. chlamydospora*, *E. lata*, *Botryosphaeriaceae* spp.

Le profil de réponses de la vigne à *P. oligandrum* seul, est très différent de celui observé lorsque l'agent pathogène est uniquement présent sur la plante ou lorsque les 2 micro-organismes colonisent le végétal. Suite à la colonisation des racines par l'oomycète, le végétal ne répond pas ou très peu, la tendance étant plutôt à une faible répression des gènes étudiés. En présence de *P. chlamydospora* seul, l'induction des gènes est relativement forte 14 jours après le début de l'infection. La colonisation de la plante par les 2 micro-organismes change considérablement le profil d'expression des gènes. Ainsi les plants pré-traités par *P. oligandrum*, répondent plus vite et plus fortement à l'attaque de *P.*

*chlamydospora* en comparaison aux plants inoculés uniquement avec l'agent pathogène. Une plante pré-inoculée par l'agent de lutte biologique, montre une forte induction des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des phytoalexines, des enzymes de détoxification ainsi que des protéines de la paroi, sept jours après infection par *P. chlamydospora*. Pour les protéines PR, seuls trois gènes (PR1, GLU et PER) sont significativement surexprimés.

Ces résultats sont en accord avec les résultats de Mohamed *et al.* (2007) qui ont montré que suite à un traitement, au niveau des racines, par *P. oligandrum*, les gènes codant pour les  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU) et stilbène synthases (STS) sont surexprimés lors d'une attaque par *Botrytis cinerea*. Takenaka *et al.* (2011) ont également montré qu'un traitement racinaire des plants de tomate par les protéines de la paroi cellulaire (CWP) de *P. oligandrum* entraîne une surexpression des gènes codant pour la PAL et certaines PR protéines, e.g. GLU. Dans la présente étude, au bout de 14 jours, seuls les plants colonisés par *P. oligandrum* et infectés par *P. chlamydospora* ont les gènes impliqués dans le renforcement de la paroi végétale et du tryptophane fortement exprimés. Ceci pourrait correspondre à une stratégie de la plante afin de limiter le développement du pathogène. La surexpression des gènes codant pour des molécules renforçant la paroi (callose et lignine) permettrait de renforcer cette barrière et limiterait la pénétration par d'autres agents pathogènes. La voie du tryptophane étant impliquée dans la synthèse de l'auxine, la surexpression de l'antranilate synthase (ANTS) et de la chorismate synthase (CHORS) permettrait de stimuler la croissance de la plante.

Généralement, l'application de *P. oligandrum* ou de ses protéines élicitrices active la voie de signalisation de l'acide jasmonique et celle de l'éthylène (Takahashi *et al.*, 2006 et Kawamura *et al.*, 2009), alors qu'il n'est pas connu pour activer la voie de l'acide salicylique (Takahashi *et al.*, 2006). Dans notre étude, la voie de l'éthylène est activée dans les plants traités par *P. oligandrum* puis inoculés par *P. chlamydospora*. Concernant la voie de l'acide jasmonique et celle de l'acide salicylique, aucun des gènes étudiés n'est directement impliqué dans ces deux voies de signalisation. Un dosage de ces deux acides au niveau des tissus des plants traités par *P. oligandrum* puis inoculés par *P. chlamydospora* pourrait nous donner une idée de l'activation ou non de ces deux voies de signalisation.

La comparaison du profil de réponse de la vigne inoculée seulement par *P. oligandrum* par rapport au celui d'une plante inoculée par *P. oligandrum* puis infectée par *P. chlamydospora*, montre que les mécanismes de défense de la vigne ne sont induits qu'en cas d'infection par *P. chlamydospora*. L'hypothèse d'un effet potentialisateur ou « priming » est donc envisageable. La potentialisation est un état physiologique qui permet à la plante d'induire plus vite et plus intensément ses mécanismes de défense lorsqu'elle est soumise à un stress (Conrath, 2009). Cet effet « priming » a déjà été décrit chez la vigne par

Theocharis *et al.* (2010). Ces auteurs ont montré qu'un traitement avec la souche PsJN de *Burkholderia phytofirmans* stimule les défenses des plants de vigne uniquement lors d'un stress biotique, dans ce cas le froid.

Cette première approche par RT-PCR a donc apporté des éléments intéressants sur le type de résistance mis en place lors de l'interaction tripartite vigne / *P. oligandrum* / *P. chlamydospora*. Cependant, afin de ne pas limiter l'étude à 22 gènes généraux impliqués dans les systèmes de défense mais d'obtenir une vision plus large et plus originale des réponses globales de la vigne à un micro-organisme nécrotrophe et un agent de biocontrôle, un microarray vigne (technologie Nimblegen) permettant de suivre 29 549 gènes a été utilisé.

Les résultats montrent que plusieurs tendances d'expression de gènes sont semblables à celles obtenues par RT-qPCR avec le « set » de 22 gènes. Premièrement, la méthode d'inoculation par « perçage du tronc » provoque des modifications importantes au niveau du métabolisme de la plante. Ce stress abiotique, est non négligeable puisqu'à près 14 jours, il a induit l'expression différentielle de 1371 gènes. Deuxièmement, les résultats micro-arrays confirment que le traitement des racines de vigne par *P. oligandrum* n'induit que très peu de modifications au niveau du tronc. En comparaison des 2235 et 1858 gènes significativement modifiés respectivement par l'agent pathogène, *P. chlamydospora*, et les inoculations par *P. oligandrum* puis *P. chlamydospora*, 189 gènes sont modifiés suite à la colonisation racinaire par *P. oligandrum* seul. Parmi eux, 159 gènes sont communs à d'autres interactions, seuls 30 gènes sont spécifiques à cette relation. L'analyse statistique montre qu'ils n'induisent aucun changement significatif de catégorie ou sous-catégorie fonctionnelle de gène.

Dans la suite du texte, plusieurs gènes spécifiques ont été ciblés afin de caractériser chaque traitement et d'identifier certains gènes marqueurs de l'interaction. Les profils de réponse de la vigne sont différents selon les traitements par les micro-organismes.

#### *Induction des « lipid transfert protein » (LTP) suite à l'inoculation par P. chlamydospora*

Dans notre étude la réponse de la vigne à l'agent pathogène est caractérisée par une forte induction de transcrits de la famille des LTP. D'après Espinosa *et al.* (2007), cette famille de protéines est spécifiquement associée aux infections par des virus. Les auteurs ont étudié par analyse transcriptomique (microarrays *Vitis vinifera* GeneChip®, Affymetrix) l'expression des gènes de deux variétés de vigne, Carménère et Cabernet Sauvignon, infectées naturellement par un virus (GLRaV-3). Ils ont observé que la famille des LTP représentait un des principaux groupes de gènes surexprimés dans l'interaction. Les LTP ont

été associées à la réponse hypersensible (HR) chez le poivron et chez *Arabidopsis thaliana* pour les plants présentant des nécroses virales (Sohal *et al.* 1999 ; Park *et al.* 2002), mais leur rôle dans les interactions compatibles n'a pas été observé (Espinoza *et al.* 2007).

De futures études devront être réalisées afin de comprendre pourquoi cette famille de gènes est stimulée dans le cas présent.

#### *Induction des lipides suite à l'inoculation par P. chlamydospora*

Le métabolisme des lipides, plus précisément la synthèse de phospholipides, est induit lors de l'infection par *P. chlamydospora*. Albertazzi *et al.* 2009 ont relevé une répression importante du métabolisme des lipides et notamment des phospholipides, sur Chardonnay, cépage sensible au phytoplasme du bois noir. Cette voie métabolique est associée à un stress biotique qui dans notre étude est surexprimé, là aussi ce phénomène devra être étudié à l'avenir.

#### *L'organisation cellulaire et la synthèse de cellulose sont modifiées en présence de P. chlamydospora*

Plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans la division cellulaire sont induits en présence de *P. chlamydospora*. Des transcrits codant pour des gènes de la famille des tubulines, actines et des « kinesin-like proteins » sont surexprimés de manière importante. En parallèle, l'activité des « cellulose synthases » est globalement réprimée. Ces observations suggèrent une activité significative de multiplication cellulaire chez la plante, probablement qu'un renforcement des parois cellulaires se mettrait également en place. Ce phénomène pourrait être assimilé à un mécanisme de défense de la plante, elle chercherait à consolider sa paroi afin d'arrêter ou de retarder la progression intracellulaire du pathogène. Une autre hypothèse peut également être envisagée : l'agent pathogène pourrait induire des modifications dans la régulation des processus cellulaires afin de favoriser sa pénétration et son invasion dans les cellules de la plante hôte.

#### *Le métabolisme des auxines est modifié en présence de P. chlamydospora*

Les auxines sont des phytohormones essentielles au développement des plantes, incluant l'embryogénèse, la différenciation des tissus, la croissance des tiges et des racines, le développement des fruits (Böttcher *et al.* 2012). Le métabolisme des auxines est réprimé en présence de *P. chlamydospora*, indiquant une orientation du métabolisme de la plante vers la mise en place de systèmes de défense contre le pathogène. Toutefois aucun

nanisme n'a été observé, que ce soit au niveau des feuilles, du tronc ou des racines des jeunes plants de vigne.

Il est également intéressant de noter que l'interaction vigne / *P. chlamydospora* peut être caractérisée par la répression des récepteurs kinases de type LRR VIII et la surexpression de régulateurs de la transcription. Ces transcrits représentent des marqueurs potentiels d'infection.

Une autre catégorie de gènes qui est réprimée est celle du statut redox, via la répression des « non-symbiotic hemoglobins ». Ces protéines ont la capacité de détoxifier les molécules réactives de l'azote comme l'oxyde nitrique (NO) (Dordas *et al.* 2003 ; Perazzoli *et al.* 2004). La répression de cette voie doit favoriser l'accumulation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) dans les cellules infectées, leur permettant ainsi de se défendre contre l'agent pathogène.

Après avoir commenté les principales modifications transcriptionnelles observées suite à l'infection du tronc de jeunes plants de vigne par *P. chlamydospora*. Une analyse des catégories fonctionnelles de gènes spécifiquement modulées lors de l'interaction tripartite plante / *P. oligandrum* / *P. chlamydospora* est présentée ci-après.

#### *La régulation des ARN dans l'interaction plante / P. oligandrum / P. chlamydospora*

Lors de cette interaction tripartite, une répression des facteurs de transcription (TFs) de la famille des AP2/ERF et une surexpression de ceux de la famille des MYB est observée. Ces familles sont associées aux réponses de défense de la plante (Agarwal et Jha 2010 ; Dubos *et al.* 2010). Par exemple, Albertazzi *et al.* (2009) ont montré que les MYB étaient spécifiquement surexprimés chez un cépage résistant au bois noir, le Manzoni, en comparaison d'un cépage hautement sensible, le Chardonnay. La surexpression des MYB dans notre interaction est probablement associée à la meilleure résistance des plants traités par *P. oligandrum* contre *P. chlamydospora*, telle qu'elle a été montrée au niveau de la réduction des nécroses dues au pathogène.

#### *Modification des métabolismes hormonaux et secondaires lors de l'interaction plante / P. oligandrum / P. chlamydospora*

De manière originale, des gènes codant pour la synthèse de la lignine dans la voie des phénylpropanoïdes, ainsi que le métabolisme du jasmonate sont réprimés dans l'interaction tripartite. Ces voies sont impliquées dans les réponses de défense de la plante et sont classiquement surexprimées en réponse à un stress (Bari et Jones 2009; Bhuiyan *et al.* 2009; Wasternack et Hause 2013). Par contre, la voie de l'éthylène est surexprimée. Ces

observations suggèrent que la protection contre *P. chlamydospora* est principalement associée à l'induction de la voie de l'éthylène.

*La voie du calcium est fortement réprimée lors de l'interaction plante / P. oligandrum / P. chlamydospora*

Un des résultats les plus inattendus est la répression de la voie de signalisation du calcium. Cette catégorie de gènes est en effet la plus significativement réprimée, les transcrits codent essentiellement pour une « EF hand calcium binding protein ». Habituellement, en réponse à la présence de micro-organismes, la voie du calcium est activée (Dodd *et al.* 2010 ; Lecourieux-Ouaked *et al.* 2000 ; Tena *et al.* 2011). Il est possible que ce phénomène précoce dans les réponses de la plante ne soit pas observable car notre étude a été réalisée 14 jours après inoculation par l'agent pathogène.

*Modification du métabolisme des carbohydrates lors de l'interaction plante / P. oligandrum / P. chlamydospora*

Des études de l'interaction plante / agent infectieux ont montré que le métabolisme des carbohydrates est stimulé au cours de processus d'infection (Gamm *et al.* 2011 ; Hren *et al.* 2009), suggérant une utilisation des sucres par l'agent pathogène. Dans nos travaux la répression de cette voie doit être une stratégie de la plante pour limiter l'action de l'agent pathogène.

En conclusion, l'oomycète *P. oligandrum* a montré des capacités à coloniser durablement la rhizosphère de jeunes plants de vigne et à induire les systèmes de défense de la plante afin qu'elle puisse se protéger contre une attaque par l'agent nécrotrophe *P. chlamydospora*. L'analyse transcriptomique par microarrays a permis de souligner les originalités de chaque interaction. Les gènes spécifiques constituent des marqueurs potentiels qu'il conviendra de valider, premièrement par PCRq puis lors de nouvelles expérimentations en plein champ. D'autre part les résultats montrent l'importance de la voie de l'éthylène, la combinaison de molécules favorisant cette voie pourrait augmenter les niveaux de protection contre *P. chlamydospora*.

# 6

## Chapitre

# Discussion générale et conclusions

L'utilisation de produits de synthèse chimiques est un moyen de protection des plantes que l'ensemble des acteurs du monde agricole souhaite fortement réduire. Le développement de méthodes de lutte alternatives est donc fortement encouragé et dans ce contexte, la lutte biologique ou biocontrôle, à laquelle de nombreuses recherches scientifiques sont dédiées, est un moyen prometteur. Dans ce contexte, le sujet de la présente thèse a été d'étudier les propriétés intrinsèques d'un agent de biocontrôle, *Pythium oligandrum*, tant au niveau de sa structure génétique, que des relations qu'il établit avec une plante, la vigne, qui présente un intérêt économique considérable en France, et dans la région viticole de Bordeaux.

La lutte biologique par utilisation de micro-organismes a un potentiel de développement considérable et nous avons souhaité montrer ses avantages et limites à partir de l'exemple de *P. oligandrum*. Cet oomycète a été choisi car notre groupe a réalisé depuis environ une quinzaine d'années plusieurs études sur le sujet et d'autres équipes ont également montré son intérêt pour protéger les plantes contre de nombreuses infections par les bioagresseurs (Benhamou *et al.* 2012 ; Gerbore *et al.* 2013 ; Rey *et al.* 2008). La complexité, l'originalité dans certains cas, des relations que *P. oligandrum* établit au sein de la rhizosphère avec les agents pathogènes, les autres micro-organismes, dont ceux potentiellement bénéfiques pour le végétal, et la plante, constitue un champ d'étude considérable et scientifiquement très riche.

Au niveau des relations avec les autres micro-organismes, il a ainsi été montré que lors d'interactions avec plusieurs champignons ou oomycètes, *P. oligandrum* peut ajuster son « système d'attaque » en fonction de l'hôte, il agira ainsi par mycoparasitisme, associé ou non à l'antibiose. Il faut aussi tenir compte du fait que certains hôtes sont capables de se défendre et parfois de dégrader les souches de *P. oligandrum*. Ce point a été particulièrement étudié lorsque *P. oligandrum* a été combiné avec 2 autres agents de lutte, *T. harzianum* et Fo47. Ces agents de biocontrôle détruisaient par mycoparasitisme et antibiose les hyphes de *P. oligandrum* lors de confrontations directes en boîtes de Petri. Par contre lors d'essais en serre, une analyse par microscopie électronique à transmission a montré que *P. oligandrum* était attaqué par *T. harzianum* ou Fo47 seulement lorsqu'ils étaient en contact étroit, sinon les trois micro-organismes pouvaient persister dans la rhizosphère (Le Floch *et al.* 2009). La variété des interactions, leurs fréquences *in situ*, vont donc influencer sur la persistance des agents de lutte biologique *in situ*. Ce point doit être considéré avec attention lors de la réalisation d'essais en lutte biologique.

Cette aptitude antagoniste de *P. oligandrum* a été exploitée lors de plusieurs expérimentations où une confrontation directe entre l'agent de biocontrôle et le pathogène était recherchée (Vesely 1977 ; Walther et Gindrat 1987). Par exemple, afin de lutter contre la fonte des semis due à *P. ultimum*, des graines de cresson ont été enrobées avec *P. oligandrum*. Le contact direct entre les 2 espèces de *Pythium* aboutissait à la destruction des hyphes du pathogène par l'antagoniste, il en résultait un taux de protection en plein-champ aussi élevé qu'après utilisation de fongicides (Mc Quilken *et al.* 1990). A l'inverse, lors d'essais sur betterave sucrière (Vesely 1989), l'utilisation d'une préparation commerciale à base d'oospores n'a pas donné de résultats satisfaisants en Tchécoslovaquie. La qualité de l'inoculum peut être remise en cause dans ce dernier cas, mais au delà de cet aspect, lors de l'utilisation d'agents de biocontrôle, il est important de considérer le large spectre des interactions entre micro-organismes, celles-ci pouvant selon les cas, réduire ou accroître l'efficacité de la lutte biologique.

La plupart des expérimentations utilisant *P. oligandrum* comme agent de biocontrôle ont cependant montré que la résistance induite chez les plantes constituait le principal mécanisme par lequel il exerçait une protection sur le végétal. Toutefois, cela nécessite une bonne implantation de l'agent de biocontrôle tout au long de la saison culturale. Comme mentionné dans la littérature, *P. oligandrum* peut coloniser la rhizosphère sur une longue période de temps (Al-Rawahi et Hancock, 1998 ; Le Floch *et al.* 2003a ; McQuilken *et al.* 1990 ; Takenaka *et al.* 2008). Les conditions de culture exercent néanmoins un effet non négligeable sur cette persistance sur le végétal. Par exemple, en culture hors-sol la

colonisation racinaire de cet oomycète dépend de la nature des substrats. Rey *et al.* (1999) ont ainsi montré qu'un niveau élevé de colonisation était obtenu avec un substrat organique (tourbe) par rapport à un substrat inorganique (laine de roche). Les stratégies d'inoculation doivent donc être adaptées au type de culture.

Pour améliorer la colonisation de *P. oligandrum* dans la durée ainsi que l'effet protecteur, il est possible de sélectionner des souches présentant des traits spécifiques liés à la persistance et à l'émission de molécules impliquées dans l'induction de résistance ou la promotion de croissance du végétal. Ce type d'expérimentations a été réalisé par Vallance *et al.* (2009) lorsqu'ils ont sélectionné 3 souches de *P. oligandrum* sur la base de leur aptitude à former des structures de conservation (oospores), produire un éliciteur (l'oligandrine) ainsi qu'un composé de type auxinique (la tryptamine). Cette approche a permis d'assurer la colonisation des racines durant la période d'expérimentation (7 mois). Cependant, cette étude a aussi démontré que le choix des critères de sélection des souches est crucial. En effet, l'expérience faite en laboratoire pour sélectionner les souches de *P. oligandrum* ne reflète pas nécessairement leurs capacités à coloniser les racines dans les conditions de la serre. Ainsi la souche qui produisait le moins d'oospores *in vitro* est celle qui colonisait le plus fortement les racines en culture hors-sol. A l'heure actuelle, la recherche d'une méthode de criblage pertinente et efficace pour la sélection de souches de *P. oligandrum* en lutte biologique est en cours d'étude.

Une autre option, décrite lors du chapitre 3 de cette thèse, consiste à isoler des souches de l'agent de lutte biologique à partir de la plante que l'on souhaite protéger. Ayant cet objectif en vue, nous avons isolé des souches de *P. oligandrum* à partir de racines de ceps de vigne provenant de différents vignobles du Bordelais. Il est important de noter que ce vignoble peut être divisé en 3 ensembles géologiques où les sols vont différer dans leurs compositions et leurs teneurs en sable, caillou, argile et calcaire. Par exemple, les sols du Libournais sont principalement de type argilo-limoneux, ceux des Graves sont graveleux et ceux du Médoc contiennent des mélanges sablo-graveleux. Ce point est important car la texture des sols exerce une influence sur les communautés microbiennes. Kandeler *et al.* (2000) ont montré que des fines particules d'argile (0,1-2  $\mu\text{m}$ ) ou de limon (2-63  $\mu\text{m}$ ) étaient plus faiblement colonisées par les communautés fongiques que celles de sable ayant des dimensions nettement plus importantes (250-2000  $\mu\text{m}$ ).

Dans notre expérimentation, les analyses des communautés fongiques et bactériennes globales obtenues par empreinte moléculaire (SSCP) ont montré qu'il y avait une différence chez les champignons colonisant les racines des ceps échantillonnés dans la région des Graves par rapport à ceux provenant du Libournais et du Médoc. Cette différence

n'a pas été observée avec les bactéries alors que plusieurs auteurs (Badin *et al.* 2012; Sessitsch *et al.* 2001) rapportent que ce type de micro-organismes colonise préférentiellement les petites particules qui leur offrent un habitat protecteur par rapport à celles de plus grandes tailles. Il est cependant important de noter que nous avons étudié les communautés microbiennes colonisant la rhizosphère placée dans différents contextes telluriques et non directement les micro-organismes présents sur les particules du sol. La correspondance avec les études sur les sols n'est donc pas complète, la rhizosphère créant un habitat spécifique pour les bactéries et champignons, et elle atténue certainement l'effet associé à la texture des sols.

Au sein de ces sols, et dans ce contexte abiotique et biotique, des *Pythium* aux oospores échinulées ont été isolés à partir de racines des mêmes ceps échantillonnés 2 années consécutives dans les 12 vignobles du Bordelais (4 pour chaque région : Libournais, Graves et Médoc). La prépondérance des souches de *P. oligandrum* parmi ces isolats a été mise en évidence après séquençage de la région ITS. L'analyse des bases nucléotidiques d'autres gènes, utilisés classiquement en phylogénie moléculaire, et codant pour la cytochrome oxidase I et une tubuline a permis de constituer en 3 groupes de souches. Le séquençage d'autres gènes codant pour les élicitines-like protéines a confirmé qu'au moins un gène codant pour une oligandrine et un autre pour une CWP étaient présents dans chaque souche. Six groupes ont pu être formés. Mais pour chacun des 2 ensembles formés, aucun n'était associé à une région particulière. Il semble donc que le type de sol et la microflore globale associée à la rhizosphère, n'exercent pas une influence suffisante pour que la structure génétique des populations de *P. oligandrum* soit typiquement associée à un contexte abiotique-biotique particulier.

Il a été en revanche observé, dans les travaux de thèse, que certains facteurs, comme le type de porte-greffe ou la gestion de l'enherbement basée sur l'application d'herbicides ou le labour, avaient une influence sur le taux de colonisation des racines par les *Pythium* échinulés et donc sur *P. oligandrum*. Ce point mérite d'être considéré car il permettra d'orienter les stratégies de protection des plantes. Une application d'agents de lutte biologique sans tenir compte des facteurs cultureux est ainsi à déconseiller. En se basant sur ces résultats, un système qui intégrera le type de plante, *e.g.* le porte-greffe, la gestion phytosanitaire, *e.g.* les herbicides, et le micro-organisme, *e.g.* *P. oligandrum*, sera à considérer car il permettra d'optimiser la réussite des applications en lutte biologique.

La présente étude a montré que *P. oligandrum* était isolé de façon relativement aisée de la rhizosphère des ceps de la région de Bordeaux. Toutefois ce résultat est en

contradiction avec les travaux de Spies *et al.* (2011) sur la recherche et l'identification des espèces de *Pythium* associées aux racines de plants de vigne, jeunes ou matures, dans différents sites viticoles, vignobles ou pépinières, en Afrique du Sud. Ils ont identifié 22 *Pythium* spp. 3 espèces pathogènes étaient les plus fréquemment isolées: *P. irregulare*, *P. heterothalicum* et *P. vexans*. En ce qui concerne les espèces de *Pythium* colonisant nos échantillons de racines une étude préliminaire en pyroséquençage réalisée en collaboration avec le Dr André Lévesques (Agriculture et Agroalimentaire Canada, CRECO, Ottawa) a montré qu'au niveau des oomycètes, deux ordres, les *Peronosporales* (70% des séquences) et les *Pythiales* (23%), étaient les principaux colonisateurs de la rhizosphère des ceps. Au niveau du genre, *Phytophythium* (70% des séquences) et *Pythium* (23%) étaient les plus nombreux. Dix espèces de *Pythium*, dont *P. oligandrum*, étaient détectées. L'espèce la plus fréquente était cependant *Phytophythium cucurbitacearum*, elle fait partie d'un nouveau genre, *Phytophythium*, différent de *Pythium*, et qui a été récemment déterminé par Bala *et al.* (2010a,b). Cette étude est cependant préliminaire, les échantillons de racines traités ayant été regroupés, sans distinction de la zone d'origine, et plusieurs séquences n'ont pu être assignées au niveau de l'espèce, mais uniquement à celui du genre. La comparaison des résultats montre cependant que de fortes différences existent entre les espèces retrouvées en Afrique du Sud et en France, les causes de ces disparités doivent certainement être multifactorielles : les types de sols, les porte-greffes, le climat, le microbiote associé aux racines, les traitements phytosanitaires, etc. Ces facteurs doivent certainement avoir une influence mais leur hiérarchisation, ou même leurs implications dans cette diversité microbienne, doit encore être étudiée.

Plusieurs souches de *P. oligandrum* ont été isolées de la rhizosphère de ceps de vigne et il nous a semblé judicieux de préciser le type d'interaction que ce micro-organisme pouvait établir avec la plante. Les premières études sur le sujet réalisées par Rey *et al.* (1998a) et Le Floch *et al.* (2005) avaient en effet montré l'originalité de la relation qu'il établissait avec les racines de tomate. Le terme d'« opportuniste, symbionte avirulent de plante » utilisé à l'origine par Harman *et al.* (2004) pour décrire les relations entre *Trichoderma* spp. et les végétaux, semble tout à fait approprié à l'espèce *P. oligandrum* comme l'ont d'ailleurs indiqué Rey *et al.* (2008) et Benhamou *et al.* (2012). Le terme opportuniste s'applique à la capacité de ces 2 types de micro-organismes à pénétrer, généralement pour une période courte, dans la plante. *P. oligandrum*, du fait de la rapidité et de la profondeur avec laquelle il colonise les tissus racinaires, se démarque singulièrement de *Trichoderma* (Le Floch *et al.* 2009). Dans les deux cas, même si cette colonisation est éphémère car le colonisateur sera détruit *in planta*, elle est suivie d'une induction de

résistance locale ou systémique permettant au végétal de lutter contre de nombreuses attaques par des agents pathogènes. En ce sens le terme avirulent s'applique à ces 2 micro-organismes.

Cependant, lors de cette thèse, nous avons voulu préciser quels étaient les changements induits chez la plante suite à la colonisation initiale des racines par *P. oligandrum*. La technologie d'analyse transcriptomique utilisée ici, à partir d'un microarray *Vitis vinifera* (29 549 gènes), permet d'évaluer le niveau d'expression de très nombreux gènes et de déterminer quelles voies métaboliques sont sur ou sous-exprimées. Il s'agissait également de préciser les premières observations qui avaient été faites en utilisant de jeunes plants de tomate mais en observant cette fois les relations établies avec un végétal très différent, la vigne.

Il a ainsi été montré que de jeunes plants de vigne répondent à la colonisation racinaire en modifiant l'expression de gènes de plusieurs voies métaboliques. *P. oligandrum* serait perçu comme (1) un agresseur contre lequel la plante a mis en place des réactions de défense mais en même temps, également comme (2) un micro-organisme symbiotique car un certain nombre de modifications transcriptionnelles étaient similaires à celles rapportées dans les interactions rhizosphériques symbiotiques (e.g. forte stimulation de gènes codant pour des subtilases).

(1) Concernant le premier point, plusieurs modifications transcriptionnelles indiquent que la plante réagit à la présence de l'oomycète en mettant en place ce qui peut être considéré comme des systèmes de défense. Ainsi la voie de la signalisation du calcium est activée, de même que plusieurs protéines kinases qui ont un rôle dans le déclenchement d'influx intracellulaires de  $Ca^{2+}$ . Cet événement est particulièrement important dans le fonctionnement de l'immunité primaire de la plante. Autre élément à considérer, si la première ligne de défense de la plante est contournée par un agent pathogène, certains végétaux peuvent synthétiser des protéines de résistance à partir de transcrits de la famille des Rgènes. Or, en réponse à la colonisation des tissus racinaires par *P. oligandrum*, 30 gènes de résistance (des Rgenes) sont significativement induits chez les racines de vigne, ce qui suggère qu'une interaction race-spécifique commence à se mettre en place. Le métabolisme secondaire est également modifié via la voie des terpenoïdes et celle des flavonoïdes, cette dernière pouvant conduire à la synthèse de composés antimicrobiens comme les phytoalexines.

Les fonctions associées à d'autres modifications métaboliques pourraient préparer la plante à l'induction de résistance observée suite à cette interaction. Par exemple, le métabolisme de l'acide abscissique (ABA) est fortement activé ce qui peut avoir des

répercussions sur d'autres voies, comme celle de l'acide salicylique (AS) qui est inhibée. Or, dans la littérature, la voie de l'AS n'est pas observée lors de la mise en place de la résistance chez le végétal suite à l'inoculation des plants par *P. oligandrum* (Hase *et al.* 2008 ; Kawamura *et al.* 2009). L'activation d'autres familles géniques, comme celle des facteurs de transcription de type Ethylene-Responsive element binding Factor (ERF), pourrait conférer à la plante la capacité à se défendre. Cette propriété a été observée par Zhang *et al.* (2009) chez des tabacs transgéniques qui surexprimaient le facteur de transcription AP2/ERF. D'autres gènes ayant un rôle central dans la résistance aux agents pathogènes biotrophes et hémibiotrophes (Wiermer *et al.* 2005) sont activés, *i.e.* la « Enhanced Disease Susceptibility 1 » (EDS1) et la « Phytoalexin Deficient 4 » (PAD4). Ces événements suggèrent que la plante oriente une partie de son métabolisme vers la synthèse de molécules associées à la défense contre *P. oligandrum*, en même temps ces modifications vont préparer le végétal à la résistance observée contre plusieurs bioagresseurs.

(2) Un aspect étonnant de cette interaction est qu'à côté des événements décrits ci-avant, d'autres vont présenter des similitudes avec ceux observés dans les relations symbiotiques. Le plus typique de ces événements est la forte stimulation de gènes codant pour des subtilases. Ces molécules sont impliquées dans des interactions symbiotiques très diverses, comme celles entre les racines et les champignons mycorrhiziens à arbuscules (AM), ou entre les légumineuses et les bactéries fixatrices d'azote du type rhizobium (Takeda *et al.* 2007). Il est intéressant de noter que suite à l'application de protéines élicitrices de la paroi de *P. oligandrum* (POD 1 et POD 2) sur des feuilles d'*Arabidopsis thaliana*, des gènes codant pour des subtilases étaient fortement exprimés. Compte tenu des connaissances sur ces molécules, la détermination de leur rôle précis dans l'interaction entre *P. oligandrum* et la vigne serait à étudier. Cette expérimentation permettrait aussi d'approfondir les recherches visant à déterminer les événements transcriptomiques qui s'apparentent à une relation pathogène ou symbiotique.

La présence de *P. oligandrum* au niveau des racines de vigne induit donc un certain nombre de modifications transcriptionnelles, cette interaction semble préparer la vigne à la mise en place d'une défense efficace contre les agents pathogènes.

Lors des travaux de thèse, une expérimentation sous serre conduite durant 2 années consécutives a effectivement montré que les plants traités par *P. oligandrum* développaient une résistance contre l'agent nécrotrophe, *P. chlamydospora*. La réduction des nécroses dans le tronc, en moyenne de 50 % en 2010, observée chez les plants colonisés par l'oomycète, suggère une induction de résistance systémique. Ce phénomène a été rapporté

chez plusieurs plantes (Gerbore *et al.* 2013), notamment contre la pourriture grise de la vigne (Mohamed *et al.* 2007). Toutefois, à notre connaissance, nous montrons pour la première fois qu'il est possible de protéger la vigne par induction de résistance contre un agent nécrotrophe. Ces résultats sont particulièrement intéressants car *P. chlamydospora* est un agent pathogène impliqué dans l'esca, une maladie du bois pour laquelle aucune méthode de lutte efficace n'est actuellement disponible (Bertsch *et al.* 2013).

La stimulation des défenses de la plante a été étudiée au niveau du tronc par RT-PCRq à l'aide d'un ensemble de 22 gènes associés aux mécanismes de défense généraux de la vigne (Dufour *et al.* 2012). En présence de *P. chlamydospora* seul, la plante active majoritairement les gènes codant pour les protéines PR, 14 jours après l'infection, les nécroses atteignant 80 % de la hauteur des plants à la fin de l'essai. Ces protéines PR sont également induites par le stress abiotique du perçage. En revanche, lorsque les racines sont préalablement colonisées par *P. oligandrum*, une induction de résistance est observée, la vigne répondant plus fortement et plus rapidement à l'infection par le pathogène. Les défenses de la plante sont plus fortement induites 7 jours après infection et concernent les voies de biosynthèse des phytoalexines (stilbène synthases), des enzymes de détoxification et des protéines de la paroi. Des gènes similaires étaient induits par *P. oligandrum*, *i.e.* les phytoalexines, dans les travaux de Mohamed *et al.* (2007) et Takenaka *et al.* (2011).

D'autres mécanismes que les principaux systèmes de défense connus chez la plante doivent être mis en jeu spécifiquement dans chaque interaction. Des analyses globales du transcriptome de la vigne, en réponse aux micro-organismes, ont été entreprises via l'utilisation de microarrays vigne de chez Nimblegen. L'interaction tripartite vigne / *P. chlamydospora* / *P. oligandrum* a révélé des profils de régulation de gènes très différents. Le plus grand nombre de gènes différentiellement exprimés a été observé en présence de *P. chlamydospora* seul. *P. oligandrum* seul n'a induit que très peu de modifications transcriptionnelles (189 gènes), tandis qu'en présence de *P. oligandrum* et *P. chlamydospora* les modifications concernent 1858 gènes. Pour caractériser la typicité des interactions, les changements du niveau d'expression de gènes induisant une modification significative de catégories ou familles fonctionnelles ont été analysés.

L'interaction vigne / *P. chlamydospora* est plus particulièrement marquée par l'induction de gènes de la famille des Lipid Transfert Proteins (LTP), du métabolisme des lipides (synthèse des phospholipides), de la multiplication cellulaire et de la répression du métabolisme des auxines.

L'interaction vigne / *P. oligandrum* / *P. chlamydospora* est caractérisée par une régulation originale des facteurs de transcription (TF) ; Les TF de type MYB sont induits et les TF de type AP2/ERF sont fortement réprimés. La voie de l'éthylène, favorisant la résistance (Albertazzi *et al.* 2009 ; Bari et Jones 2009), est activée tandis que celle du calcium est très fortement réprimée. La répression du métabolisme des carbohydrates semble indiquer que la plante limite la production de sucres qui pourraient bénéficier au pathogène (Gamm *et al.* 2011; Hren *et al.* 2009). Aucune catégorie fonctionnelle n'est significativement modifiée par *P. oligandrum*.

Ces différentes voies, différenciellement régulées, représentent un panel de marqueurs génétiques de l'état de la plante qu'il conviendra de valider par PCRq.

L'étude moléculaire de l'interaction tripartite *P. oligandrum* / vigne / *P. chlamydospora* a montré la capacité de *P. oligandrum* à induire des modifications transcriptionnelles dont la stimulation des réactions de défense. Les résultats permettent de proposer le scénario suivant : la vigne colonisée par *P. oligandrum* au niveau racinaire détecte l'oomycète, l'interaction présente des aspects dits « race-spécifiques » et les mécanismes de défense sont alors majoritairement potentialisés au niveau du tronc. Lorsque ces plants sont attaqués au niveau du tronc, la plante réagit rapidement, fortement et devient plus résistante. Cette reprogrammation des jeunes plants de vigne induite par l'oomycète est corrélée avec une protection accrue des jeunes plants de vigne à l'attaque de l'agent nécrotrophe *P. chlamydospora*. Une stratégie de protection des ceps de vigne au vignoble contre l'esca serait par conséquent envisageable.

Avant d'utiliser *P. oligandrum* au vignoble, il est intéressant de replacer l'utilisation d'un agent de biocontrôle parmi les actions actuellement possibles ou envisagées pour lutter contre les maladies du bois. Deux actions dites (i) directes ou (ii) indirectes peuvent être décrites :

- (i) directe lorsque l'action recherchée est sur les microorganismes pathogènes, cela correspond à des traitements curatifs comme ceux réalisés jusqu'en 2001 en France avec l'arsénite de sodium, mais depuis son retrait ce type de traitement n'est plus réalisé. D'autres possibilités existent, par exemple de récents travaux réalisés par Emilie Bruez (2013) ont montré que le bois sains de ceps de vigne est colonisé par de nombreuses bactéries, certaines d'entre elles ayant un effet contre les agents pathogènes de l'esca (communication personnelle de Rana

Haidar). Ainsi il serait possible de contrôler, au moins, partiellement les champignons impliqués dans l'esca en utilisant des bactéries capables de coloniser le bois des ceps et douées de capacités antagonistes contre ces agents pathogènes.

- (ii) Les stratégies indirectes concernent les méthodes prophylactiques de suppression ou limitation des sources d'inoculum primaire tel que le ramassage des bois de taille sur la parcelle de vigne. Le mode de conduite peut également exercer un rôle, par exemple, la taille tardive permet de limiter les contaminations par les plaies. Les systèmes de taille « longue » respectent les trajets de sève et sont moins mutilantes pour la plante ce qui au final réduira les risques de dépérissements des ceps. Les produits de protection des plaies de taille limitent aussi l'entrée des agents pathogènes à l'intérieur des plants. Cette stratégie semble efficace contre l'eutypiose mais son action est plus restreinte pour l'esca (Lecomte communication personnelle). En effet les champignons associés à cette maladie sont déjà naturellement présents dans le bois des ceps. D'autres actions sont possibles comme la complantation (arrache du cep atteint et plantation d'un nouveau pied de vigne), le recépage ou le greffage (P. Lecomte communication personnelle).

Etant donné la complexité de l'esca il serait intéressant de combiner plusieurs moyens de lutte contre cette maladie. Ainsi, la combinaison: traitement microbien par *P. oligandrum* au niveau de la rhizosphère des ceps avec la protection des plaies de taille via des barrières physiques (utilisation de mastics ou de résines) ou chimiques à l'aide de produits fongicides, permettrait de réduire la pression d'inoculum ce qui aiderait la plante puisqu'elle aurait à se défendre contre une population d'agents pathogènes moins importante.

Les niveaux de protections obtenus avec *P. oligandrum* contre *P. chlamydospora*, un des agents pathogènes impliqués dans l'esca étaient partiels (de 30 à 50%). Néanmoins, aucun traitement phytosanitaire n'étant actuellement disponible, une réduction de cet ordre dans les parcelles de vigne n'est pas négligeable. Il faut aussi avoir à l'esprit qu'un cep qui présente des symptômes foliaires une année, peut être asymptomatique l'année suivante, et dans certains cas les symptômes peuvent même disparaître. En conséquence, une résistance, même partielle, des ceps peut permettre à une plante d'exprimer moins de symptômes. La production de ces ceps sera aussi prolongée, ce qui

représente un point crucial au niveau économique pour le viticulteur. L'autre point à considérer est que le pourcentage de protection observé dans notre essai a été obtenu dans des conditions très favorables pour l'agent pathogène. Afin de faciliter l'infection, la tige était percée et *P. chlamydospora* était introduit dans cette ouverture. Au vignoble, on peut penser que ce type d'infection, *i.e.* une grande quantité de *P. chlamydospora* apportée sur une large plaie et donc une pression d'inoculum importante est plus rare. Dans ce cas la protection induite par *P. oligandrum* pourrait être supérieure à celle obtenue dans notre expérimentation. Pour y répondre, de futurs essais réalisés dans les parcelles durant une période de temps moyenne à longue seront réalisés.

Quelle stratégie de traitements des plantes adopter avec *P. oligandrum*?

Les résultats des travaux de thèse ont montré que *P. oligandrum* persistait 4 mois dans la rhizosphère de jeunes plants de vigne. En se basant sur ces résultats, des essais au vignoble pourraient être réalisés en faisant 3 applications, soit tous les 4 mois, afin d'assurer une colonisation de la rhizosphère tout au long de l'année.

Une autre option serait d'évaluer l'intérêt d'un (ou deux) traitement(s) plus intense(s) pour les ceps qui expriment la maladie l'année *n* puis observer le taux de réexpression de la maladie les années suivantes. L'application via une suspension de spore pulvérisée au pied des ceps, de la même manière que pour un herbicide, semble appropriée dans notre cas. La meilleure période d'application serait à rechercher, mais il serait logique de réaliser cet apport massif au printemps. Les paramètres importants pour le développement de *P. oligandrum* dans la rhizosphère de vigne seront la température et l'humidité. L'utilisation de souches naturellement présentes au vignoble devrait faciliter l'implantation de cet agent de biocontrôle.

Agents de biocontrôle microbien et produits de synthèse chimique : est-il possible d'utiliser ces 2 approches ?

D'une manière plus générale, l'idée que les luttes biologique et chimique s'opposent est présente dans de nombreux esprits. Les deux méthodes peuvent pourtant être employées et même combinées dans certains cas pour protéger les cultures. En fait, ces deux méthodes sont difficilement comparables. Pour mémoire, la matière active d'un pesticide est une molécule chimique, tandis que pour un agent de biocontrôle, c'est un micro-organisme qui établit une relation dynamique avec le végétal. Une bactérie ou un champignon sont des organismes vivants avec des spécificités et des potentialités qu'une molécule chimique classique ne possède pas. Généralement une action immédiate est recherchée avec les pesticides, alors qu'avec les agents de biocontrôle, l'objectif est plus

subtil. Son action bénéfique et durable peut être observée après plusieurs applications sur une période de temps plus ou moins longue, le micro-organisme établissant alors des relations diverses avec son environnement. Un programme de protection intégrée, associant l'utilisation de produit chimique en alternance avec des produits de biocontrôle pourrait permettre de réduire l'impact sur l'environnement tout en préservant des niveaux de protection économiquement acceptable. Ce type de programme nécessite notamment l'étude de la compatibilité entre l'agent de biocontrôle microbien utilisé et les produits phytosanitaires chimiques employés. Les travaux de cette thèse ont montré que *P. oligandrum* été présent dans les différents vignobles étudiés et donc capable de se développer malgré l'utilisation des pesticides chimiques. Cependant certains produits peuvent être plus ou moins favorables au maintien d'un niveau de population du micro-organisme important. Nous avons ainsi observé que les herbicides pouvaient avoir un effet sur les populations globales de *Pythium* échinulés, donc de *P. oligandrum*.

Malgré les progrès remarquables accomplis ces dernières années, plusieurs questions restent à élucider avant d'aboutir à une généralisation du biocontrôle en agriculture. L'effort commun des intervenants du secteur agricole (scientifiques, gouvernements, entreprises) rappelle que relever le défi de protéger les plantes cultivées contre leurs bioagresseurs, tout en préservant le patrimoine environnemental, nécessite non seulement de renforcer les approches pluridisciplinaires visant le développement de méthodes biologiques fiables, durables, et rentables, mais aussi de promouvoir un changement radical dans les pratiques culturelles traditionnelles.

# 7

## Chapitre

# Perspectives

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

### **Evaluer la persistance dans les vignobles**

Les expérimentations réalisées dans le cadre de cette thèse ont permis d'isoler des souches de *P. oligandrum* ayant des potentialités certaines en terme d'induction de résistance. Plusieurs d'entre elles possèdent des éliciteurs (oligandrine et CWP) dont les gènes ont été identifiés et séquencés. Ces informations ont permis de créer 6 groupes nommés Elicitin Like Protein profiles (ELP) et à l'intérieur de chacun d'eux, les souches les plus intéressantes en terme de production d'oligandrine pourront être choisies pour de futurs essais de protection des plantes. Ces souches ayant été isolées de la rhizosphère de ceps de vigne, des essais sur cette plante seront donc réalisés en priorité. Au delà de l'aspect protection, il s'agira d'évaluer la persistance des souches de *P. oligandrum* au niveau du système racinaire des ceps au vignoble sur une longue période, soit une saison culturale.

### **Apprécier la résilience de l'écosystème**

L'effet de l'apport massif d'un agent de lutte biologique dans l'environnement d'une plante, pose aussi la question de son impact sur la biodiversité de la microflore colonisant naturellement le végétal. Lors d'expérimentation antérieures, Vallance *et al.* (2009, 2012) ont étudié l'impact de *P. oligandrum* sur les communautés fongiques et bactériennes colonisant

la rhizosphère des plants de tomate. Une analyse par empreinte moléculaire, Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP), a révélé que 6 mois après inoculation de la rhizosphère par *P. oligandrum*, les communautés fongiques indigènes étaient similaires à celles des racines de plants de tomate témoins (non inoculées par *P. oligandrum*). L'analyse des communautés bactériennes a révélé des perturbations transitoires dans les communautés rhizosphériques rapidement après l'inoculation par *P. oligandrum*, mais ces changements ne persistent pas durant la saison culturale (Vallance *et al.* 2012). En fait, dans les deux études, les modifications observées dans les communautés bactériennes et fongiques étaient associées au cycle de vie des plantes, mais l'agent de lutte biologique a eu globalement peu ou pas d'influence sur la microflore indigène. Ce même type d'essai pourra être réalisé au vignoble sur une période de plusieurs années, en appliquant *P. oligandrum* dans la rhizosphère de plants jeunes ou matures. Un prélèvement racinaire initial permettra d'obtenir une description plus ou moins exhaustive de l'écosystème à un moment donné, puis le prélèvement d'échantillons dans le temps, donnera une image dynamique de l'évolution de la microflore. La technique de pyroséquençage pourra être utilisée car elle permettra d'apprécier la résilience de l'écosystème et de connaître précisément les espèces ou genres microbiens qui seront apparus ou disparus au cours du temps.

### **Explorer la promotion de croissance des plantes**

Des essais sur d'autres plantes pourraient néanmoins être envisagés, car des expérimentations préliminaires ont montré que 2 souches de *P. oligandrum* isolées chez la vigne, protégeaient et même induisaient une promotion de croissance chez la tomate (communication personnelle de Mme Nada Ouhaibi, collaboration avec l'Institut Supérieur Agronomique de Chott-Mariem en Tunisie) et chez une plante ornementale nommée *Dipladenia* (communication personnelle du Dr Jean-Marc Deogratias, collaboration avec le GIE Fleurs et Plantes du Sud-Ouest). Chez *P. oligandrum*, le phénomène de promotion de croissance des plantes a été associé à la production de composés auxiniques. Le Floch *et al.* (2003) ont montré que la voie de la tryptamine existait chez *P. oligandrum* et qu'il est capable de synthétiser ce composé auxinique, la tryptamine, à partir du tryptophane et de l'indole-3-acétaldéhyde. La tryptamine étant absorbée par le système racinaire, la formation de racines secondaires était alors stimulée. Ce phénomène pourrait être étudié ici en comparant la synthèse de molécules auxiniques selon les souches de *P. oligandrum* et selon les plantes utilisées.

### Déterminer des marqueurs génétiques de protection 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 résultats ont été obtenus au niveau du tronc, mais des expérimentations sont en cours pour analyser l'expression des gènes au niveau des feuilles. L'objectif serait qu'à moyen terme, en prélevant des feuilles et en ciblant certains gènes par RT-PCRq, l'état physiologique de la plante soit connu, *i.e.* la résistance est induite fortement ou non. Le même type d'essai en serre pourra être réalisé mais en faisant un séquençage global des ARNm présents dans l'interaction plante/pathogène/agent de biocontrôle. Cette technologie nommée RNAseq offre une excellente résolution quant aux molécules issues de la vigne (épissage alternatif des ARNm, séquences additionnelles car non prédites par le séquençage de la vigne) ainsi qu'un accès aux molécules issues des micro-organismes (effecteurs et autres). Cette technologie apporterait des informations moléculaires sur les gènes de la vigne induits par la présence des micro-organismes ainsi que sur l'état physiologique du champignon infectieux (*P. chlamydospora*) ou de l'agent de lutte biologique (*P. oligandrum*). Des séquences spécifiques des micro-organismes seront alors obtenues, ce qui aidera dans l'exploration moléculaire de la relation plante-pathogène-agent de biocontrôle. Cette approche est cependant actuellement limitée du fait de la rareté des données moléculaires sur les champignons impliqués dans les maladies du bois de la vigne, mais le séquençage complet du génome de plusieurs d'entre eux, dont *P. chlamydospora*, est en cours (Baumgartner, USDA, Davis, USA, communication personnelle), il en est de même pour le génome de *P. oligandrum*, ce qui permettrait de réaliser ce type d'expérimentations.

### Développer une stratégie combinant les agents de biocontrôle

Afin d'améliorer les niveaux de protection par un agent de biocontrôle, une stratégie consiste à combiner plusieurs micro-organismes. Les combinaisons peuvent être faites en associant, soit des souches de la même espèce, soit de plusieurs espèces différentes. Dans le cas de *P. oligandrum*, Le Floch *et al.* (2009) ont démontré qu'en combinant l'oomycète avec *Fo47* et/ou *T. harzianum*, une résistance était induite chez la tomate contre *B. cinerea*, mais aucune différence significative n'était obtenue entre les applications de *P. oligandrum* seul ou avec les 2 autres champignons. Les effets de synergie entre les agents de biocontrôle sont certainement intéressants pour augmenter les niveaux de colonisation du végétal, mais cela ne signifie pas obligatoirement que le niveau de protection des plantes

sera augmenté. Xu *et al.* (2011b) rapportent que les effets synergiques entre les agents de lutte biologique sont difficiles à prévoir et nécessitent une connaissance fine de leurs interactions. Selon ces auteurs (Xu *et al.* 2010 et 2011a), un agent de biocontrôle possédant un seul mode d'action principal est moins efficace dans le contrôle d'une maladie qu'un autre combinant deux mécanismes ; et la combinaison de deux agents de lutte biologique, avec des modes d'action distincts, n'est généralement pas meilleure que l'application d'un seul micro-organisme qui combine les deux modes d'action. Dans le cas de la lutte contre les maladies du bois, l'introduction de *P. oligandrum* dans la rhizosphère pourrait être combinée avec l'inoculation de micro-organismes au niveau du tronc. Cette approche ciblant 2 organes de la plante pour lutter contre une maladie a été peu décrite. Des essais sont en cours à l'UMR SAVE sur ce thème en utilisant des bactéries.

Au final, l'objectif de ces différentes perspectives est d'optimiser la protection apportée sur le végétal par *P. oligandrum*. Il s'agit d'obtenir une efficacité stable et la plus élevée possible, afin d'apporter des solutions aux agriculteurs lors de cette phase de transition des moyens de protection des plantes à laquelle ils sont confrontés.

# Références Bibliographiques

- Abdalla MA, Win HY, Islam MT, 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
- Abdelghani EY, Bala K, Paul B (2004) Characterisation of *Pythium paroecandrum* and its antagonism towards *Botrytis cinerea*, the causative agent of grey mould disease of grape. *FEMS Microbiol Lett* 230(2):177-183
- Abdelzaher HA, Elnaghy M, Fadi-Allah E (1997) Isolation of *Pythium oligandrum* from Egyptian soil and its mycoparasitic effect on *Pythium ultimum* var. *ultimum* the damping-off organism of wheat. *Mycopathol* 139(2):97-106
- 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
- Adalat K, Whiting C, Rooney S, Gubler WD (2000) Pathogenicity of three species of *Phaeoacremonium* spp. on grapevine in California. *Phytopathol Mediterr* 39:92–99
- Adie BA, Perez-Perez J et al (2007) ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defences in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:1665–1681
- Agarwal PK, Jha B (2010) Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. *Biol Planta* 54(2):201-212
- Ait Barka E, Belarbi A, Hachet C, Nowak J, Audran JC (2000) Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 186:91–95
- Ait Barka E, Gognies S, Nowak J, Audran JC, Belarbi A (2002) Inhibitory effect of bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biol Control*

24:135–142

- Al-hamdani AM, Cooke RC (1983) Effects of the mycoparasite *Pythium oligandrum* on cellulolysis and sclerotium production by *Rhizoctonia solani*. *Trans Br Mycol Soc* 81:619-621
- Al-hamdani AM, Lutchmeah RS, Cooke RC (1983) Biological control of *Pythium ultimum*-induced damping-off by treating cress seed with the mycoparasite *Pythium oligandrum*. *Plant Pathol* 32(4):449-45
- Al-Rawahi AK, Hancock JG (1997) Rhizosphere competence of *Pythium oligandrum*. *Phytopathol* 87(9):951-959
- Al-Rawahi AK, Hancock JG (1998) Parasitism and biological control of *Verticillium dahliae* by *Pythium oligandrum*. *Plant Dis* 82:1100-1106
- Alabouvette C, Couteaudier Y, Louvet J (1983) Soils suppressive to *Fusarium* wilt: mechanism and management of suppressiveness. In: Parker CA (ed) *The ecology and management of soilborne plant pathogens*. American Phytopathological Society, St Paul, pp 101-106
- Alabouvette C, Lemanceau P (1999) Joint action of microbials for disease control. In: Hall F, Menn J (eds) *Biopesticides: use and delivery. Methods in biotechnology*. Humana, Totowa, pp 117-135
- Alabouvette C, Olivain C, Migheli Q, Steinberg C (2009) Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytol.* 184:529–544
- Alabouvette C, Olivain C, Steinberg C (2006) Biological control of plant diseases: the European situation. *Eur J Plant Pathol* 114:329–341
- Alabouvette C, Rouxel F, Louvet J (1979) Characteristics of *Fusarium* wilt suppressive soils and prospects for their utilization in biological control. In: Schippers B, Gams W (eds), *Soil-borne plant pathogens*. Academic, London, pp 165-183
- 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(6):792-804
- Alfonzo A, Conigliaro G, Torta L, Burrmano S, Moschetti G (2009) Antagonism of *Bacillus subtilis* strain AG1 against vine wood fungal pathogens. *Phytopathol Mediterr* 48:155–158
- Ali-Shtayeh MS (1985) *Pythium* populations in Middle Eastern soils relative to different cropping practices. *Trans Br Mycol Soc* 84:695–700
- Amborabe BE, Fleurat-Lessard P, Chollet JF, Roblin G, (2002) Antifungal effects of salicylic acid and other benzoic acid derivatives towards *Eutypa lata*: structure– activity

- relationship. *Plant Physiol and Biochemistry* 40:1051–60
- Amponsah NT, Jones EE, Ridgway HJ, Jaspers MV (2012) Susceptibility of grapevine tissues to *Neofusicoccum luteum* conidial infection. *Plant Pathol* 61: 719-729
- Amreen T, Kumar VBS (2012) In vitro evaluation of native *Trichoderma harzianum* against major fungal pathogen of flower and fruit crops. *Env and Ecol* 30:1039- 1041
- Anderson IC, Cairney JWG (2004) Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Env Microbiol.* 6:769-779
- Angeli D, Ferrari A, Elad Y, Pertot I (2006) Evaluation of new control agents against grapevine powdery mildew under greenhouse conditions. *IOBC/wprs Bulletin Vol.29* (11) pp. 89-92)
- Angeli D, Longa CMO, Bozza E, Maines L, Elad Y, Simeone V, Assaf HA, Pertot I (2007) Evaluation of new biological control agents against grapevine powdery mildew under greenhouse conditions. *International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants West Palaearctic Regional Section: Working Group; Integrated Control of Plant Pathogens: Proceedings of the Meeting ;Fundamental and Practice Approaches to Increase Biocontrol; Part 1, Spa, Belgium, 6-10 September 2006., pp 37-42*
- Angelova Z, Georgiev S, Roos W (2006) Elicitation of plants. *Biotechnol and Biotechnolo Equi* 20(2):72
- Antoniw JF, Dunkley AM, White RF, Wood J (1980) Soluble leaf proteins of virus- infected tobacco (*Nicotiana tabacum*) cultivars. *Biochem Soc Trans.* 8 :70-81
- Arnaud G, Arnaud M, (1931) *Traité de Pathologie Végétal. Encyclopédie Mycologique.* Lechevalier, Vol. 3 and 4
- Aroca A, Luque J, Raposo R (2008) First report of *Phaeoacremonium viticola* affecting grapevines in Spain. *Plant Pathol* 57:386-386
- Avis TJ, Gravel V, Antoun H, Tweddell RJ (2008) Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biol Biochem.* 40:1733-1740
- 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
- Badin AL, Mustafa T, Bertrand C, Monier A, Delolme C, Geremia RA, Bedell, JP (2012) Microbial communities of urban stormwater sediments: the phylogenetic structure of bacterial communities varies with porosity. *FEMS microbiology ecology* 81:324-338

- Baker GC, Smith JJ, Cowan DA (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods*. 55:541-555
- Baker R (1968) Mechanisms of biological control of soil-borne pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 6(1):263-294
- Bakkeren G, Kronstad JW, and Levesque CA (2000) Comparison of AFLP fingerprints and ITS sequences as phylogenetic markers in Ustilaginomycetes. *Mycologia* 92:510–521
- Bakshi, S, Szejnberg A, Yarden O (2001) Isolation and characterization of a cold-tolerant strain of *Fusarium proliferatum*, a biocontrol agent of grape downy mildew. *Phytopathol* 91(11):1062-1068
- Bala K, Robideau GP, Désaulniers N, de Cock AWAM, Lévesque CA (2010a) Taxonomy, DNA barcoding and phylogeny of three new species of *Pythium* from Canada. *Persoonia* 25:22–31
- Bala K, Robideau GP, Lévesque CA et al. (2010b) *Phytopythium* Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, gen. nov. and *Phytopythium sindhum* Lodhi, Shahzad & Lévesque, sp. nov. *Persoonia*, 24:136–137
- Balestrini R, Magurno F, Walker C, Lumini E, Bianciotto V (2010) Cohorts of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in *Vitis vinifera*, a typical Mediterranean fruit crop. *Environ Microb Reports* 2:594-604
- Bari R, Jones JDG (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol*. 69(4):473-488
- Bell CR, Dickie GA, Harvey WLG, Chan JWYF (1995) Endophytic bacteria in grapevine. *Can J Microbiol* 41:46-53
- Bellée A (2012) Agressivité de Botryosphaeriaceae spp et défenses moléculaires de vitis vinifera. Mémoire de Master2 Recherche Biologie et Biotechnologie des plantes, Université Victor Segalen de Bordeaux, France 27p
- Benhamou N, Belanger RR, 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 plants. *Plant Physiol and Biochem* 39:681-696
- 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(8):730-740
- Benhamou N, Garand C, Goulet A (2002) Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. *Appl Environ Microbiol* 68(8):4044-4060
- Benhamou N, le Floch G, Vallance J, Gerbore J, Grizard D, Rey P (2012) *Pythium oligandrum*: an example of opportunistic success. *Microbiol sgm* 158:2679–2694

- 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*. *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
- Benitez T, Rincon AM, Limon MC, Codon AC (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol* 7(4):249-260
- Bertelli E, Mugnai L, Surico G (1998) Presence of *Phaeoacremonium chlamydosporum* in apparently healthy rooted grapevine cuttings. *Phytopathol Mediterr* 37:79-82
- Bertsch C, Ramirez-Suero M, Magnin-Robert M, Larignon P, Chong J, Abou-Mansour E, et al (2013) Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathol* 62: 243-265
- Bester W, Crous PW, Fourie PH (2007) Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species. *Austral Plant Pathol* 36:73-77
- Bhuiyan NH, Selvaraj G, Wei Y, King J (2009) Role of lignification in plant defense. *Plant signaling & behavior*, 4(2):158-159
- Blanco JL (1997) La plus vieille histoire du vin. In *L'Histoire du vin, une histoire de rites* Office International de la Vigne et du Vin, eds, pp 31–41
- Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr Opin Plant Biol* 4(4):343-350
- Boller T, Felix G (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60:379-406
- Bonnet P, Bourdon E, Ponchet M, Blein JP, Ricci P (1996) Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *Eur J Plant Pathol* 102:181–192
- Bordiec S, Rabenoelina F, Mazeyrat-Gourbeyre F, Christophe Clément et Baillieux F (2010) RNA extraction from grapevine woody canes for gene expression analysis by real-time RT-PCR. In *Methodologies and Results in Grapevine Research*, (Delrot S, Medrano H, Or E, Bavaresco L, Grando S eds) 19:295-300
- Both M, Csukai M, Stumpf MP, Spanu PD (2005) Gene expression profiles of *Blumeria graminis* indicate dynamic changes to primary metabolism during development of an obligate biotrophic pathogen. *Plant Cell* 17:2107–2122

- Böttcher C, Dennis EG, Booker GW, Polyak SW, Boss PK, Davies C (2012) A novel tool for studying auxin-metabolism: the inhibition of grapevine indole-3-acetic acid-amido synthetases by a reaction intermediate analogue. *PLoS one*. 7(5):e37632
- Boudet AM, Lapierre C, Grima-Pettenati J (1995) Biochemistry and molecular biology of lignification. *New phytologist* 129:203–236
- Bradley DJ, Kjellbom P, Lamb CJ (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 RP, Whalley WM, Craig GD (1991) Interactions between *Pythium oligandrum* and the fungal footrot pathogens of peas. *Mycol Res* 95:861-865
- Brozova J (2002) Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. *Plant Prot Sci* 38(1):29-35
- Bruetz E, Lecomte P, Grosman J, Doublet B, Bertsch C, Fontaine F, Ugaglia A, Teisseidre PL, Guerin-Dubrana L, Rey P (2013) Overview of the grapevine trunk diseases in France in the early 2000s. *Phytopathol Mediterr* (in press)
- Brun JP, Laubenheimer F (2001) La viticulture en Gaule. *Gallia* 58:203–219
- 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
- Buée M, De Boer W, Martin F, Van Overbeek L, Jurkevitch E (2009) The rhizosphere zoo: an overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant and Soil* 321:189-212
- Bull AT (1970) Inhibition of polysaccharases by melanin: enzyme inhibition in relation to mycolysis. *Arch Biochem Biophys* 137(2):345-356
- Burr TJ, Reid CL (1994) Biological control of grape crown gall with nontumorigenic *Agrobacterium vitis* strain F2/5. *Am J Enol Vitic* 45:213–219
- Burr TJ, Reid CL, Tagliati E, Bazzi C, Suzle S (1997) Biological control of grape crown gall by strain F2/5 is not associated with agrocin production or competition for attachment sites on grape cells. *Phytopathol* 87:706–711
- Büschges R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, van Daelen R, van der Lee T, Diergaarde P, Groenendijk J, Töpsch S, Vos P, Salamini F, Schulze-Lefert P (1997) The barley Mlo gene: A novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88:695–705
- Butler EE (1957) *Rhizoctonia solani* as a parasite of fungi. *Mycol* 49(3):354-373
- Calzarano F, Di Marco S, Cesari A (2004) Benefit of fungicide treatment after trunk renewal of vines with different types of esca necrosis. *Phytopathol Mediterr* 43:116-124

- 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(6):1719-1737
- Cangahuala-Inocente GC, Da Silva MF, Johnson JM, Manga A, van Tuinen D, Henry C, Lovato PE, Dumas-Gaudot E (2011) Arbuscular mycorrhizal symbiosis elicits proteome responses opposite of P-starvation in SO4 grapevine rootstock upon root colonisation with two *Glomus* species. *Mycorrhiza* 21(6):473-493
- Castoria R, De Curtis F, Lima G, Caputo L, Pacifico S, De Cicco V (2001). *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Postharvest Biol Tech* 22(1):7-17
- Chacón MR, Rodríguez Galán O, Benítez Fernández T, Sousa S, Rey M, Llobell A, Delgado Jarana J (2007) Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by "*Trichoderma harzianum*" *International microbiology: official journal of the Spanish Society for Microbiology* 10:19-28
- Chave M, Dabert P, Brun R, Godon JJ, Poncet C (2008) Dynamics of rhizoplane bacterial communities subjected to physicochemical treatments in hydroponic crops, *Crop Protec.* 27:418-426
- Chen CN, Chu CC, Zentella R, Pan SM, Ho THD (2002) AtHVA22 gene family in *Arabidopsis*: phylogenetic relationship, ABA and stress regulation, and tissue-specific expression. *Plant Mol Biol* 49(6):631-642
- Cheong H, Chang HS, Gupta R, Wang X, Luan S, (2002) Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress and hormonal responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129:661-677
- Chiarappa L (1959) Wood decay of the grapevine and its relationship with black measles disease. *Phytopathol* 49:510-519
- Chuche J (2010) Comportement de *Scaphoideus titanus*, conséquences spatiales et démographiques. Thèse de doctorat, Université Victor Segalen de Bordeaux, France 216 p
- Colebrook EH, Creissen G, McGrann GRD, Dreos R, Lamb C, Boyd LA (2012) Broad-Spectrum Acquired Resistance in Barley Induced by the *Pseudomonas* Pathosystem Shares Transcriptional Components with *Arabidopsis* Systemic Acquired Resistance. *Mol Plant Microbe Interact* 25(5):658-667
- Collinge DB, Jorgensen HJL, Lund OS, Lyngkjær MF (2010) Engineering Pathogen Resistance in Crop Plants: Current Trends and Future Prospects. *Annual Review of Phytopathology* 48:269-91
- Comont G, Corio-Costet MF, Larignon P, Delmotte F (2010) AFLP markers reveal two

- genetic groups in the French population of the grapevine fungal pathogen *Phaeoconiella chlamydospora*. Eur J Plant Pathol 127:451-464
- Compant S, Brader G, Muzammil S, Sessitsch A, Lebrühi A, Mathieu F, (2012) Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. Bio Control pp 1-21
- Conrath U (2009) Priming of induced plant defense responses. In: Loon LCV (ed) Adv Bot Res, Academic Press, pp 361-395
- Conrath U, Pieterse CMJ, Mauch-Mani B (2002) Priming in plant-pathogen interactions. Trends Plant Sci 7(5):210-216
- Cooney T, Nonhebel H (1991) Biosynthesis of indole-3-acetic acid in tomato shoots: measurement, mass-spectral identification and incorporation of  $^2\text{H}$  from  $^2\text{H}_2\text{O}$  into indole-3-acetic acid, D- and L-tryptophan, indole-3-pyruvate and tryptamine. Planta 184 (3):368-376
- Cordero, MJ, Raventos, D, San Segundo, B (1994) Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection: systemic wound-response of a monocot gene. Plant J 6:141-150
- Corio-Costet MF (2012) Fungicide resistance in *Plasmopara viticola* in France and anti resistance measures. CAB international 2012. In: Fungicide Resistance in crop protection: Risk and management (ed. TS Thind), pp 157-171. Sous presse
- Cortesi P, Fischer M, Milgroom MG (2000) Identification and spread of *Fomitiporia punctata* associated with wood decay of grapevine showing symptoms of esca. Phytopathol 90: 967-972
- Cother EJ, Gilbert RL (1993) Comparative pathogenicity of *Pythium* species associated with poor seedling establishment of rice in Southern Australia. Plant Pathol 42(2):151-157
- Crisp P, Wicks TJ, Bruer D, Scott ES (2006) An evaluation of biological and abiotic controls for grapevine powdery mildew. 2. Vineyard trials. Aust J Grape Wine R 12(3):203-211
- Crous PW, Gams W (2000) *Phaeoconiella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. Phytopathol Mediterr 39: 112-118
- Crous PW, Gams W, Wingfield MJ, VanWyk PS (1996) *Phaeoacremonium* gen nov associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections Mycologia 88:786-796
- Cwalina-Ambroziak B, Nowak M (2012) The effects of biological and chemical controls on fungal communities colonising tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants and soil. Folia Hort 24:13-20

- 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(2):511-522
- Damm U, Fourie P (2005) A cost-effective protocol for molecular detection of fungal pathogens in soil. *S Afr J Sci* 101: 135-139
- Dangl JL, Jones JDG (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature (London)* 411:826-833
- Dao TTH, Linthorst HJM, Verpoorte R (2011) Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochem Rev* 10(3):397-412
- Daoust RA, Hofstein R (1996) *Ampelomyces quisqualis*, a new biofungicide to control powdery mildew in grapes. Brighton Crop Protection Conference: Pests & Diseases - 1996. Volume 1. Proceedings of an International Conference, Brighton, UK, 18-21 November, 1996, pp 33-40
- David DR (2007) Development of biocontrol of powdery mildew diseases. International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants West Palaearctic Regional Section: Working Group; Integrated Control of Plant Pathogens; Proceedings of the Meeting &quot;Fundamental and Practice Approaches to Increase Biocontrol; Part 1, Spa, Belgium, 6-10 September 2006, pp 11-15
- De Bruyne T, Pieters L, Deelstra H, Vlietinck A (1999) Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochem Syst Ecol* 27:445-459
- Del Río Conesa (2002) Study of Petri Disease in Grapevine. Proposal of a Possible Solution. *Nutri-Fitos* 77-84
- Delbès C, Moletta R, Godon JJ (2000) Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ Microbiol.* 2:506-515
- Di Marco S, Calzarano F, Gams W, Cesari A (2000) A new wood decay of kiwifruit in Italy. *N Z J Crop Hortic Sci* 28:69-72
- Di Marco S, Osti F, Cesari A (2004) Experiments on the control of esca by *Trichoderma*. *Phytopathol Mediterr* 43:108-15
- Di Marco Sd, Osti F, Roberti R, Calzarano F, Cesari A (2002) Activity of *Trichoderma* species towards *Phaeomoniella chlamydospora*, a pathogen associated with esca on grapevine. *Atti, Giornate fitopatologiche, Baselga di Pine, Trento, Italy, 7-11 aprile 2002, Volume 2, pp 419-424*
- Dodd AN, Kudla J, Sanders D (2010) The language of calcium signaling. *Annu Rev Plant Biol* 61:593-620
- Domingo JL, Giné Bordonaba J (2011) A literature review on the safety assessment of

- genetically modified plants. *Environment International* 37:734-42
- Dordas C, Hasinoff BB, Igamberdiev AU, Manac'h N, Rivoal J, Hill RD (2003) Expression of a stress-induced hemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. *Plant J* 35:763-770
- Drechsler C (1930) A new species of *Pythium*. *J Wash Acad Sci* 20(16):398-418
- Dry IB, Feechan A, Anderson C, Jermakow AM, Bouquet A, Adam-Blondon AF, Thomas MR (2010) Molecular strategies to enhance the genetic resistance of grapevines to powdery mildew. *Aus J Grape W Res* 16:94-105
- Dubos B (2002) Maladies cryptogamiques de la vigne : champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne. Bordeaux : Editions Féret, 207 pages
- Dubos B, Bulit J, Bugaret Y, Verdu D (1978) The possibilities of using *Trichoderma viride* for the biological control of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola* on grapevines. Possibilités d'utilisation du *Trichoderma viride* Pers. comme moyen biologique de lutte contre la pourriture grise (*Botrytis cinerea* Pers.) et l'excoriose (*Phomopsis viticola* Sacc.) de la vigne. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie d'Agriculture de France* 14:1159-1168
- Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L (2010) MYB transcription factors in « Arabidopsis ». *Trends Plant Sci* 15(10):573-581
- Dufour MC (2011) Etude de l'efficacité des défenses de différents génotypes de *Vitis* induites par élicitation face à la diversité génétique de bioagresseurs (*Plasmopara viticola* et *Erysiphe necator*): du gène au champ. Thèse de doctorat, Université Victor Segalen de Bordeaux, France 366 p
- Dufour MC, Lambert C, Bouscalt J, Mérillon JM, Corio-Costet MF (2012) 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*
- Edel-Hermann V, Brenot S, Gautheron N, Aime S, Alabouvette C, Steinberg C (2009) Ecological fitness of the biocontrol agent *Fusarium oxysporum* Fo47 in soil and its impact on the soil microbial communities. *FEMS Microbiol Ecol* 68:37-45
- Eibach R., Zyprian E., Welter L. et Töpfer R. (2007). The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. *Vitis* 46:120-124
- Ei-Katatny MH, Abdelzaher HMA, Shoukamy MA (2006) Antagonistic actions of *Pythium oligandrum* and *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum* and *Pythium ultimum* var. *ultimum*). *Arch Phytopathol Plant Prot* 39(4):289-301
- Elad Y (1994) Biological control of grape grey mould by *Trichoderma harzianum*. *Crop*

- Protection 13(1):35-38
- Elad Y (2001) TRICHODEX: commercialization of *Trichoderma harzianum* T39 – a case study. In: Jarvis P, ed. Agro Report, Biopesticides: Trends and Opportunities. Richmond, UK: PJB Publications Ltd, 45–50
- Elad Y, Stewart A (2004) Microbial control of Botrytis spp. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delan N ed. Botrytis: Biology, Pathology and Control. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands. pp. 223-241
- Elmer PAG, Hoyte SM, Vanneste JL, Reglinski T, Wood PN, Parry FJ (2005) Biological control of fruit pathogens. N Z Plant Protect 58:47–54
- Elmer PAG, Reglinski T, Wood PN, Hill RA, Marsden SM, Parry F, Taylor JT (2003) Suppression of Botrytis in grapes using a combination of elicitors and fungal antagonists. In: Proceedings of the 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch, New Zealand. (Abstract 43)
- Eskalen A, Gubler WD (2001) Association of spores of *Phaeoacremonium chlamydospora*, *Phaeoacremonium inflatipes*, and *Pm. aleophilum* with grapevine cordons in California. Phytopathol Mediterr 40:S429-S432
- Espinoza C, Vega A, Medina C, Schlauch K, Cramer G, Arce-Johnson P (2007) Gene expression associated with compatible viral diseases in grapevine cultivars. Funct Integr Genomic 7(2):95-110
- Evidente A, Sparapano L, Andolfi A, Bruno G (2000) Two naphthalenone pentaketides from liquid cultures of *Phaeoacremonium aleophilum*, a fungus associated with esca of grapevine. Phytopathol Mediterr 39:162-168
- Falk SP, Gadoury DM, Cortesi P, Pearson RC, Seem RC (1995a) Parasitism of *Uncinula necator* cleistothecia by the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis*. Phytopathol 85(7):794-800
- Falk SP, Gadoury DM, Pearson RC, Seem RC (1995b) Partial control of grape powdery mildew by the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis*. Plant Disease 79(5):483-490
- Falk SP, Pearson RC, Gadoury DM, Seem RC, Szejnberg A (1996) *Fusarium proliferatum* as a biocontrol agent against grape downy mildew. Phytopathol 86(10):1010-1
- FAOSTAT <http://faostat.fao.org>
- Faurie B, Cluzet S, Corio-Costet MF, Merillon JM (2009) Methyl Jasmonate/Ethephon Cotreatment Synergistically Induces Stilbene Production in *Vitis Vinifera* Cell Suspensions but Fails to Trigger Resistance to *Erysiphe necator*. J Int Sci V V 43:99-110
- Feliciano AJ, Gubler WD (2001) Histological investigations on infection of grape roots and shoots by *Phaeoacremonium* spp. Phytopathol Mediterr 40: S387-S393

- Ferreira JHS (1990) In vitro evaluation of epiphytic bacteria from table grapes for the suppression of *Botrytis cinerea*. South Afr J E Vit 11(1):38-41
- Ferreira JHS, Matthee FN, Thomas AC (1991) Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. Phytopathol 81:283–287
- Fischer M (2002) A new wood decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea*. Mycological Progress, 2002, n°1, pp 315-324
- Fletcher JT, Smewin BJ, O'Brien A (1990) *Pythium oligandrum* associated with a cropping disorder of *Agaricus bisporus*. Plant Pathol 39(4):603-605
- Flor HH (1956) The complementary genic systems in flax and flax rust. Adv Genet 8:29-54
- Flor, HH (1971) Current status of gene-for-gene concept. Annu Rev Phytopathol. 9: 275-296
- Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D (1991) Light- directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. Sci 251:767-773
- Foley MF, Deacon JW (1986) Susceptibility of *Pythium* spp. and other fungi to antagonism by the mycoparasite *Pythium oligandrum*. Soil Biol Biochem 18(1):91-95
- Fourie PH, Halleen F (2002) Investigation on the occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* in canes of rootstock mother vines. Austral Plant Pathol 31: 425-426
- Fourie PH, Halleen F (2006) Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. Eur J Plant Pathol 116:255-265
- Fourie PH, 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 40:473-8
- Fourie PH, Halleen, F (2005) Integrated strategies for proactive management of grapevine trunk diseases in nurseries. Phytopathol Mediterr 44:111
- Fourie PR, Halleen F (2004) Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material. Plant Dis 88:1241-1245
- Fowler SR, Jaspers MV, Walter M, Stewart A (1999). Suppression of overwintering *Botrytis cinerea* inoculum on grape rachii using antagonistic fungi. In Proceedings of the New Zealand plant protection conference pp. 141-147
- Frankenberger WT, Arshad M (1995) Phytohormones in soil: microbial production and function. Marcel Dekker, New York, USA
- Fravel D, Olivain C, Alabouvette C (2003) *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. New Phytol 157(3):493-502
- Fravel DR (1988) Role of antibiosis in the biocontrol of plant-diseases. Annu Rev Phytopathol 26:75-91
- Fujita K, Furuya S, Kohno M, Suzuki S, Takayanagi T (2010) Analysis of microbial community in Japanese vineyard soils by culture-independent molecular approach

- International. Journal of Wine Research 2:75-104
- Fung RW, Gonzalo M, Fekete C, Kovacs LG, He Y, Marsh E, McIntyre LM, Schachtman DP, Qiu W (2008) Powdery mildew induces defense-oriented reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine. *Plant Physiol* 146(1):236-249
- Gadberry MD, Malcomber ST, Doust AN, Kellogg EA (2005) Prisma - a flexible tool to find primers across multiple species. *Bioinformatics* 21:1263-1264
- Galet P (1982) Les maladies et parasites de la vigne tome 2. Lavoisier, France.
- Gamm M, Héloir MC, Bligny R, Vaillant-Gaveau N, Trouvelot S, Alcaraz G, et al. (2011) Changes in carbohydrate metabolism in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves. *Mol Plant-Microbe Interac* 24(9):1061-1073
- Gams W, Crous MJ, Wingf Mugnai L (1996) *Phaeoacremonium aleophilum*. In: Crous, Gams, Wingfield & Wyk, *Mycol* 88(5):791
- Gao F, Shu X, Ali MB, Howard S, Li N, Winterhagen P, et al. (2010) A functional EDS1 ortholog is differentially regulated in powdery mildew resistant and susceptible grapevines and complements an Arabidopsis eds1 mutant. *Planta* 231(5):1037-1047
- Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA (2004) affy—analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinf* 20(3):307-315
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Gen Biol* 5(10):R80
- Geoffrion R, Renaudin I (2002) Anti-Esca pruning: a useful measure against outbreaks of this old grapevine disease. *Phytoma* 554:23-27
- Gerber IB, Dubery IA (2004) Protein phosphorylation in *Nicotiana tabacum* cells in response to perception of lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Phytochem* 65:2957-2966
- 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*. *Env Sci Poll Res* 11-14
- 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 Phytopathol* 154:598-602
- Godfrey SaC, Monds RD, Lash DT, Marshall JW (2003) Identification of *Pythium oligandrum* using species-specific ITS rDNA PCR oligonucleotides. *Mycol Res* 107:790-6

- Gouadec D, Blouin J (2007) Les parasites de la vigne. Stratégies de protection raisonnée. Dunod, France
- Gouy M, Guindon S, Gascuel, O (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 27:221-224
- Graham LS, Sticklen MB (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
- Gramaje D, Maria Munoz R, Luisa Lerma M, Garcia-Jimenez J, Armengol J (2009) Fungal grapevine trunk pathogens associated with Syrah decline in Spain. *Phytopathol Mediterr* 48:396-402
- 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'épidémiosurveillance actuel. *Phytoma* 651:31-35
- Gubler WD, Baumgartner K, Browne GT, Eskalen A, Latham SR, Petit E, Bayramian LA (2004) Root diseases of grapevines in California and their control. *Austral Plant Pathol* 33:157-165
- Guether M, Balestrini R, Hannah M, He J, Udvardi MK, Bonfante P (2009) Genome wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. *New Phytol* 182(1):200-212
- Guetsky R, Shtienberg D, Elad Y, Dinoor A (2001) Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathol* 91(7):621-627
- Guetsky R, Shtienberg D, Elad Y, Fischer E, Dinoor A (2002) Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathol* 92(9):976-985
- Haas D, Defago G (2005) Biological control of soil-borne pathogens by *Fluorescent pseudomonads*. *Nat Rev Microbiol* 4:307-19
- Haggag MW, Saker MM, Ibrahim AM (2007) Biocontrol activity and molecular characterization of three *Tilletiopsis* spp. against grape powdery mildew. *Plant Protection Bulletin (Taipei)* 49(1):39-56
- Halleen F, Fourie PH (2005) Protection of grapevine pruning wounds against fungal infections. *Phytopathol Mediterr* 44:117-8
- Halleen F, Mostert L, Crous PW (2007) Pathogenicity testing of lesser-known vascular fungi of grapevines. *Australas Plant Pathol* 36(3):277-285

- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M (2004) *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol* 2(1):43-56
- 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(5):870-876
- Hayes MA, Feechan A, Dry IB (2010) Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant physiol* 153(1):211-221
- He SS, Zhang BX, Ge QX (1992) On the antagonism by hyperparasite *Pythium oligandrum*. *Acta Phytopathol Sini* 22:77-82
- Heath MC (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol* 44 :321-334
- Hein I, Gilroy EM, Armstrong MR, Birch PR (2009) The zig-zag-zig in oomycete–plant interactions. *Mol Plant Pathol* 10(4):547-562
- Heintz C, Blauch R (1990) *Verticillium lecanii* as a hyperparasite of grapevine powdery mildew (*Uncinula necator*). *Vitis* 29(4):229-232
- Helman Y, Burdman S, Okon Y (2011) Plant growth promotion by rhizosphere bacteria through direct effects. In: Rosenberg E, Gophna U (eds) *Beneficial microorganisms in multicellular life forms*, Springer Berlin Heidelberg, pp 89-103
- Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E (2012) Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiol* 158:17-25
- Ho MA, Squire LM, Sabeh NC, Giles DK, VanderGheynst JS (2005) Design and evaluation of a grapevine pruner for biofungicide application. *Bioresource technology*, 96(8):963-968
- Hofstetter V, Buyck B, Croll D, Viret O, Couloux A, Gindro K (2012) What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? *Fungal Diversity* 54: 51-67
- Hogenhout SA, Van der Hoorn RAL, Terauchi R, Kamoun S (2009) Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Mol Plant Microbe Interact* 22:115–122
- Holz G, Volkmann A (2002) Colonisation of different positions in grape bunches by potential biocontrol organisms and subsequent occurrence of *Botrytis cinerea*. IOBC/WPRS Working Group 'Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens'. Proceedings of the 7th working group meeting, Influence of abiotic and biotic factors on biocontrol agents at Pine Bay, Kusadasi, Turkey, 22-25 May 2002, pp 9-12
- Hong H, Pruden A, Reardon KF (2007) Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a

- complex microbial community remediating mine drainage. *J Microbiol Methods*. 69:52-64
- Hopkins DL (2005) Biological control of Pierce's disease in the vineyard with strains of *Xylella fastidiosa* benign to grapevine. *Plant Dis* 89:1348-1352
- Horner NR, Grenville-Briggs LJ, Van West P (2012) The oomycete *Pythium oligandrum* expresses putative effectors during mycoparasitism of *Phytophthora infestans* and is amenable to transformation. *Fungal Biol* 116(1):24-41
- Howell CR (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis* 87(1):4-10
- Hren M, Nikolić P, Rotter A, Blejec A, Terrier N, Ravnikar M, Dermastia M, Gruden K (2009) 'Bois noir' phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC gen* 10(1):460
- Huang X, Chen X, Coram T, Wang M, Kang Z (2011) Gene expression profiling of *Puccinia striiformis* f. sp. tritici during development reveals a highly dynamic transcriptome. *J Gene Geno* 38(8):357-371
- Huang XS, Wang W, Zhang Q, Liu JH (2013) A Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor, PtrbHLH, of *Poncirus trifoliata* Confers Cold Tolerance and Modulates Peroxidase-Mediated Scavenging of Hydrogen Peroxide. *Plant physiol* 162(2):1178-1194
- Hui D, Iqbal J, Lehmann K, Gase K, Saluz HP, Baldwin IT 2003. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuate* : V. Microarray analysis and further characterization of large-scale changes in herbivore-induced mRNAs. *Plant Physiol* 131:1877-1893
- Humphry M, Consonni C, Panstruga R (2006) mlo-based powdery mildew immunity: Silver bullet or simply non-host resistance? *Mol Plant Pathol* 7:605-610
- Hyakumachi M, Kubota M (2003) Fungi as plant growth promoter and disease suppressor. In: Arora DK, Bridge PD, et al. (eds) *Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications*. Mycology, CRC, Boca Raton 21:101-110
- 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(3):297-304
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostat* 4(2):249-264
- Jabs T, Tschöpe M, Colling C, Hahlbrock K, Scheel D (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O<sub>2</sub> from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(9): 4800-4805

- Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, et al (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449:449-463
- Jalloul A, Clerivet A, Nicole M (2009) La signalisation hormonale dans la résistance des plantes aux bioagresseurs. *Cahiers Agri* 18:493-497
- Jarosch B, Jansen M, Schaffrath U (2003) Acquired resistance functions in mlo barley, which is hypersusceptible to *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* 16:107-114
- Jeffers SN, and SB Martin (1986) Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Dis* 70:1038-1043
- Jeger MJ, Jeffries P, Elad Y, Xu XM (2009) A generic theoretical model for biological control of foliar plant diseases. *J Theor Biol* 256(2):201-214
- John S, Wicks TJ, Hunt JS, & Scott ES (2008) Colonisation of grapevine wood by *Trichoderma harzianum* and *Eutypa lata*. *Austr J Grape Wine Res* 14(1):18-24
- John S, Wicks TJ, Hunt JS, Lorimer MF, Oakey H, Scott ES, (2005) Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata* using *Trichoderma harzianum* and *Fusarium lateritium*. *Austr Plant Pathol* 34(4):569-575
- Jones EE, Deacon JW (1995) Mycoparasite-like behaviour of the plant pathogen *Pythium aphanidermatum* in vitro. *Plant Pathol* 44(2):396-405
- Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444(7117):323-329
- Jung HW, Tschaplinski TJ, Wang L, Glazebrook J, Greenberg JT (2009) Priming in systemic plant immunity. *Sci* 324(5923):89-91.
- Kachroo A, Kachroo P (2007) Salicylic acid-, jasmonic acid- and ethylene-mediated regulation of plant defense signaling. In: *Genetic Engineering, Principles and Methods* (Setlow J, ed) Springer, Heidelberg, Germany 28:55-83
- Kaliff M, Staal J, Myrenas M, Dixelius C (2007) ABA is required for *Leptosphaeria maculans* resistance via ABI1- and ABI4-dependent signaling. *Mol Plant Microbe Interact* 20:335-345
- Kamoun S (2006) A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:41-60
- Kandeler E, Tschirko D, Bruce KD, Stemmer M, Hobbs PJ, Bardgett RD, Amelung W (2000) Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. *Biol Fert Soils* 32: 390-400
- Kar Chun Tan KC, Ipcho SVS, Trengove RD, Oliver RP, Solomon PS (2009) Assessing the impact of transcriptomics, proteomics and metabolomics on fungal phytopathology. *Mol Plant Pathol* 10:703-715
- Kassemeyer HH, Busam G (1998) Induced resistance of grapevine - Perspectives of

- biological control of grapevine diseases. Integrated control in viticulture. Proceedings of the meeting at Godollo, Hungary, 4-6 March, 1997, pp 43-45
- Kauffmann A, Gentleman R, Huber W (2009) arrayQualityMetrics—a bioconductor package for quality assessment of microarray data. *Bioinf* 25(3):415-416
- Kawaguchi A, Inoue K, Nasu H (2005) Inhibition of crown gall formation by *Agrobacterium radiobacter* biovar 3 strains isolated from grapevine. *J Gen Plant Pathol* 71:422–430
- Kawaguchi A, Inoue K, Nasu H (2007) Biological control of grapevine crown gall by nonpathogenic *Agrobacterium vitis* strain VAR03-1. *J Gen Plant Pathol* 73:133–138
- Kawamura Y, Takenaka S, Hase S, Kubota M, Ichinose et al (2009) Enhanced defense responses in *Arabidopsis* induced by the cell wall protein fractions from *Pythium oligandrum* require SGT1, RAR1, NPR1 and JAR1. *Plant Cell Physiol* 50(5):924-934
- Keren-zur M, Lazare M, Khusid A, Bercovitz A, Rebhun M, Cohen L, Weiss B, Daus A, Karabulut OA, Tezcan H, Droby S, 2002. Development and commercial testing of the yeast *Metschnikowia fructicola* for the control of pre and postharvest diseases. *Bulletin OILB/SROP* 25, 197
- Khmel IA, Sorokina TA, Lemanova NB, Lipasova VA, Met- litski OZ, Burdeinaya TV, Chernin LS (1998) Biological control of crown gall in grapevine and raspberry by two *Pseudomonas* spp. with a wide spectrum of antagonistic activity. *Bio Sci Technol* 8:45–57
- Kilpatrick RA (1968) Seedling reaction of barley, oats and wheat to *Pythium* species. *Plant Dis* 52:209-212
- Kimsé M, Bayourthe C, Monteils V, Fortun-Lamothe L, Cauquil L, Combes S, Gidenne T (2012) Live yeast stability in rabbit digestive tract: Consequences on the caecal ecosystem, digestion, growth and digestive health. *Anim Feed Sci Tech* 173: 235-243
- Kistner C, Winzer T, Pitzschke A, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J, Webb KJ, Szczyglowski K, Parniske M (2005) Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. *Plant Cell* 17:2217-2229
- Klemmer HW, Nakano RY (1964) Distribution and pathogenicity of *Phytophthora* and *Pythium* in pineapple soils of Hawaii. *Plant Dis Rep* 48:848-852
- Kloepper JW, Zablutowicz RM, Tipping EM, Lifshitz R (1991) Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: Keister DL, Cregan PB (eds) *The rhizosphere and plant growth*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 315-326
- Kobayasi Y, Matsushima T, Takada M, Hagiwara H (1977) Reports of Japanese mycological expedition to Mts Ruwenzori, Central-Africa. *Trans Mycol Soc Jpn* 18(1):64-94
- Kobes N (2006) Maladies du bois. L'Observatoire national dresse le bilan. *Viti: de la vigne au*

- vin, 30(321):36-37.
- Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochem* 64:923-933
- Konstantinidou-Doltsinis S, Markellou E, Kasselaki AM, Siranidou E, Kalamarakis A, Tzembelikou K, Schmitt A, Koumakis C, Malathrakis N (2007) Control of powdery mildew of grape in Greece using Sporodex L and Milsana. *Journal of Plant Diseases and Protection* 114(6):256-262
- Kortemkamp A (1997) *Epicoccum nigrum*: A biological control agent of *Plasmopara viticola* (BERK. et CURT.). *Vitis* 36(4):215-216
- Kotze C, Van Niekerk J, Halleen F, Mostert L, Fourie P (2011). Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathol Mediterr* 50(4):247-263
- Kowalchuk GA, Drigo B, Yergeau E, van Veen JA (2006) Assessing bacterial and fungal community structure in soil using ribosomal RNA and other structural gene markers. In: Nannipieri P., Smalla K. (eds.), *Nucleic acids and proteins in soil*, Springer, 159-188 pp.
- Kratka J, Bergmanova E, Kudelova A (1994) Effect of *Pythium oligandrum* and *Pythium ultimum* on biochemical-changes in cucumber (*Cucumis-Sativus L*). *J Plant Dis Prot* 101(4):406-413
- Krol E (1998) Epiphytic bacteria isolated from grape leaves and its effect on *Botrytis cinerea* Pers. *Phytopathol Pol* 16:53-61
- Kuc J (1995) Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *An Rev Phytopathol* 33:275-297
- Kurtzman CP, Droby S, (2001) *Metschnikowia fructicola*, a new ascosporic yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots. *Systematic and Applied Microbiology* 24:395-9
- Lamb C, Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Phy Plant Mol Biol.* 48(1):251-275
- Lammerts Van Bueren ET, Jones SS, Tamm L, Murphy KM, Myers JR, Leifert C, Messmer MM (2011) The need to breed crop varieties suitable for organic farming, using wheat, tomato and broccoli as examples: A review. *NJAS - Wagen J Life Sciences* 58 :193-205
- Larignon P (1991) Contribution à l'identification et au mode d'action des champignons associés au syndrome de l'esca de la vigne. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux II, France 238 p
- Larignon P (2004) Réflexions sur l'esca. *Phytoma* 576:28-31

- Larignon P (2005) Diseases of wood in Midi-Pyrenees: esca and BDA. The constitution of an international work group on the diseases of wood and the first results of experiments carried out in the laboratory and in nurseries. *Progres Agricole et Viticole* 122(5):103-106
- Larignon P, Berud F, Girardon K, Dubos B (2006) Nurseries and grapevine wood diseases. *Phytoma* 592:14-17
- Larignon P, Coarer M, Girardon K, Berud F, Jacquet O (2008) Propagation of pioneer fungi associated with esca disease by vegetative material in French grapevine nurseries. *Phytopathologia Mediterranea*
- Larignon P, Dubos B (1997) Fungi associated with esca disease in grapevine. *E J Plant Pathol* 3:147-157
- Larignon P, Dupont J, Dubos B (2000) Esca disease. The biological background of two agents of the disease, *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytoma* 527:30-35
- Larignon P, Molot B (2004) Les maladies du bois expérimentations en cours et premiers résultats. *Progrès Agri et Viti* 21
- Latorre BA, Agosin E, Martin Rs Vasquez GS, San Martin R (1997) Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against *Botrytis* bunch rot of table grape in Chile. *Crop Protec* 16:209–14
- Latour X, Corberand T, Laguerre G, Allard F, Lemanceau P (1996) The composition of fluorescent pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Appl Environ Microbiol* 62: 2449–2456
- 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, Benhamou N, Mamaca E, Salerno MI, 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, 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 and Soil* 257(2):459-470
- 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(5-6):455-460

- 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 microarray and real-time PCR. *FEMS Microbiol Ecol* 61(2):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(3):288-298
- Le Hénanff G (2009) Caractérisation fonctionnelle de gènes de signalisation intervenant dans les réponses de défense aux agents pathogènes chez la vigne. Thèse de doctorat, Université de Haute- Alsace, France, 164 pages
- Lebrihi A, Errakhi R, Barakate M (2009a) New *Streptomyces barakatei* strain, culture filtrate, derived active compounds and use thereof in the treatment of plants. Patent WO/2009/156687
- Lebrihi A, Errakhi R, Barakate M (2009b) New *Streptomyces beta-vulgaris* strain, culture filtrate, derived active compounds and use thereof in the treatment of plants. Patent WO/2009/156688
- Lecomte P, Cardon , Bastien N, Giry Laterriere S (2004) Risques D'infection Par L'eutypiose Au Printemps. *Phytoma* 576:22-27
- Lecomte P, Darrietort G, Liminana JM, Comont G, Muruamendiaraz A, Legorburu FJ, 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
- Lecourieux-Ouaked F, Pugin A, Lebrun-Garcia A (2000) Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in tobacco. *Mol plant-microbe interact.* 13(8):821-829
- Lee J, Huh N, Hong JH, Kim BS, Kim GH, Kim JJ (2012) The antagonistic properties of *Trichoderma* spp. inhabiting woods for potential biological control of wood-damaging fungi. *Holzforschung* 66: 883-887
- Lee S, Kim C (2004) Biological control of powdery mildew by Q-fect WP (*Ampelomyces quisqualis* 94013) in various crops. Proceedings of a Meeting of the IOBC/WPRS Working Groups 'Management of Plant Diseases and Arthropod Pests by BCAs and their integration in Agricultural Systems', Trentino, Italy, 9-13 June 2004:pp 329-331
- Lehman LJ, McCoy RJ, Messenger BJ, Manker DC, Orjala JE, Lindhard D, Marrone PG, Jimenez DR (2000) A strain of *Bacillus pumilus* for controlling plant diseases. Patent WO/ 2000/058442

- Lherminier J, Benhamou N, Larrue J, Milat ML, Boudon-Padieu E, Nicole M, Blein JP (2003) Cytological characterization of elicitor-induced protection in tobacco plants infected by *Phytophthora parasitica* or phytoplasma. *Phytopathol* 93(10):1308-1319
- Libault M, Farmer A, Brechenmacher L, Drnevich J, Langley RJ, Bilgin DD, Radwan O, Neece DJ, Clough SJ, May GD, Stacey G (2010) Complete transcriptome of the soybean root hair cell, a single-cell model, and its alteration in response to *Bradyrhizobium japonicum* infection. *Plant Physiol* 152:541–552
- Lifshitz R, Kloepper JW, Kozlowski M, Simonson C, Carlson J, Tipping EM, Zaleska I (1987) Growth promotion of canola (Rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. *Can J Microbiol* 33(5):390-395
- Lima G, Arru S, De Curtis F, Arras G (1999) Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeasts. *Journal of Industrial Microbiol and Biotech* 23(3):223-229
- Lima G, Ippolito A, Nigro F, Romanazzi G, Schena L, Gatto MA, Salerno M (1996) Biological control of postharvest rots using *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila*. *Informatore Agrario* 52(45):79-84
- Lima G, Ippolito A, Nigro F, Salerno M (1997) Biological control of grey mould of stored table grapes by pre-harvest applications of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila*. Lotta biologica contro la muffa grigia dell'uva da tavola in conservazione mediante trattamenti pre-raccolta con *Aureobasidium pullulans* e *Candida oleophila*. *Difesa delle Piante* 20(1/2):21-28
- Liminana JM, Pavreau G, Boureau F, Menard E, David S, Himonet C, Fermaud M, Goutouly JP, Lecomte P, DUMOT V (2009) Inner necrosis in a grapevine rootstock vineyard in the cognac area. *Phytopathol Mediterr* 48:92-100
- Liu SD, Baker R (1980) Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol* 70(5):404-412
- Loqman S, Barka EA, Clement C, Ouhdouch Y (2009) Antagonistic actinomycetes from Moroccan soil to control the grapevine gray mold. *World J Microbiol Biotechnol* 25: 81-91
- Lorrain B, Ky I, Pasquier G, Jourdes M, Dubrana LG, Geny L, Rey P, Donèche B, Teissedre PL (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
- Lou BG, Wang AY, Lin C, Xu T, Zheng XD (2011) Enhancement of defense responses by oligandrin against *Botrytis cinerea* in tomatoes. *Afr J Biotechnol* 10(55):442-449
- Louvet J, Rouxel F, Alabouvette C (1976) Recherches sur la résistance des sols aux maladies, mise en évidence de la nature microbiologique de la résistance d'un sol au

- developpement de la fusanose vasculaire du melon. Ann Phytopathol 8:425-436 (French)
- Low PS, Merida, JR, (1996) The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiol Planta* 96:533-542
- Lugtenberg B and Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63:541-566
- 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. *Physiol Mol Plant Pathol* 74:403-411
- Lyon G (2007) Agents that can elicit induced resistance. In: Walters D, Newton L, Lyon G Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp 9-29
- Machowicz Stefaniak Z (1998) Antagonistic activity of epiphytic fungi from grapevine against *Botrytis cinerea* Pers. *Phytopathol Polonica* 16:45–52
- Madsen AM, de Neergaard E (1999) Interactions between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and sclerotia of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Eur J Plant Pathol* 105(8):761-768
- Magnin-Robert M, Trotel-Aziz P, Quantinet D, Biagianti S, Aziz A (2007) Biological control of *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated bacteria and stimulation of chitinase and b-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
- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dietrich RA (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Gen* 26(4):403-410
- Malone JH, Oliver B (2011) Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC biology* 9(1):34.
- Marchi G, Roberti S, D'Ovidio R, Mugnai L, Surico G (2001) Pectic enzymes production by *Phaeoconiella chlamydospora*. *Phytopathol Mediterr* 40: S407-S416
- Marchive C, Léon C, Kappel C, Coutos-Thévenot P, Corio-Costet MF, 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(1):54185
- Marles MA, Ray H, Gruber MY (2003) New perspectives on proanthocyanidin biochemistry

- and molecular regulation. *Phytochem* 64:367–383
- Marrone PG (2002) An effective biofungicide with novel modes of action. *Pest Outlook* 13(5):193-194
- Marschner P, Crowley DE, Yang CH (2004) Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant Soil* 261:199–208
- Martin D, Aubourg S, Schouwey M, Daviet L, Schalk M, Toub O, *et al.* (2010). Functional annotation, genome organization and phylogeny of the grapevine (*Vitis vinifera*) terpene synthase gene family based on genome assembly, FLcDNA cloning, and enzyme assays. *BMC Plant Biology* 10(1):226
- Martin FN, Hancock JG (1986) Association of chemical and biological factors in soils suppressive to *Pythium ultimum*. *Phytopathol* 76(11):1221-1231
- Martin FN, Hancock JG (1987) The Use of *Pythium oligandrum* for biological control of pre-emergence damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathol* 77(7):1013-1020
- Martin MT, Cobos R, Martin L, López-Enriquez L (2012) Real-time PCR detection of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*. *Appl Environ Microbiol* 78(11):3985-3991
- Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, Chaussod R, Germon JC, Soulas G, Catroux G (2001) DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl Environ Microbiol* 67:2354-2359
- Martinez C, Blanc F, Le Claire E, Besnard O, Nicole M, Baccou JC (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
- Masih EI, Alie I, Paul B (2000) Can the grey mould disease of the grape-vine be controlled by yeast? *FEMS Microbiol Let* 189:233-7
- Masih EI, Slezack Deschaumes S, Marmaras I, Barka EA, Vernet G, Charpentier C, Adholeya A, Paul 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 Microbiol Let* 202:227–32
- 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(4):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
- Mauch F, Mauch-Mani B, Boller T (1988) Antifungal hydrolases in pea tissue: II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase. *Plant Physiol* 88:936-

942

- Mauch-Mani B, Métraux JP (1998) Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany* 82:535-540
- McLaughlin RJ, Wilson CL, Droby S, Ben Arie R, Chalutz E (1992) Biological control of postharvest diseases of grape, peach, and apple with the yeasts *Kloeckera apiculata* and *Candida guilliermondii*. *Plant Dis* 76:470–3
- McLean T, Fourie PH, McLeod A (2009) Reporter gene transformation of the trunk disease pathogen *Phaeoemoniella chlamydospora* and biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Aus Plant Pathol* 38(2):153-167
- McMahan G, Yeh W, Marshall MN, Olsen M, Sananikone S, Wu JY, Block DE, VanderGheynst JS (2001) Characterizing the production of a wild-type and benomyl-resistant *Fusarium lateritium* for biocontrol of *Eutypa lata* on grapevine. *J Indus Microbiol Biotech* 26(3):151-155
- McQuilken MP, Powell HG, Budge SP, Whipps JM (1998) Effect of storage on the survival and biocontrol activity of *Pythium oligandrum* in pelleted sugar beet seed. *Biocontrol Sci Technol* 8(2):237-241
- McQuilken MP, Whipps JM, Cooke RC (1990) Control of damping-off in cress and sugar beet by commercial seed-coating with *Pythium oligandrum*. *Plant Pathol* 39: 452-462
- McQuilken MP, Whipps JM, Cooke RC (1992) Use of oospore formulations of *Pythium oligandrum* for biological control of *Pythium* damping-off in cress. *J Phytopathol* 135(2):125-134
- Mehdy MC (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol* 105:467-472
- Meszka B, Bielenin A (2010) Polyversum WP a new biological product against strawberry grey mould. *Phytopathol* 58:13-19
- Metz C, Oerke EC, & Dehne HW (2002) Biological control of grey mould (*Botrytis cinerea*) with the antagonist *Ulocladium atrum*. 54th International Symposium on Crop Protection, Part I, Gent, Belgium, 7 May, pp 353-359
- Michelland RJ, Combes S, Monteils V, Cauquil L, Gidenne T, Fortun-Lamothe L (2010) Molecular analysis of the bacterial community in digestive tract of rabbit. *Anaerobe* 16:61–65
- Michelland RJ, Dejean S, Combes S, Fortun-Lamothe L, Cauquil L (2009) StatFingerprints : a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Mol Ecol Res* 9:1359-1363
- Mitchell JI, Zuccaro A (2006) Sequences, the environment and fungi. *Mycologist*. 20:62-74
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene

- network of plants. Trends in Plant Science 9:490-498
- Mohamed N, Lherminier J, Farmer MJ, Fromentin J, Beno N, Houot V, Milat ML, Blein JP (2007) Defense responses in grapevine leaves against *Botrytis cinerea* induced by application of a *Pythium oligandrum* strain or its elicitor, oligandrin, to roots. Phytopathol 97(5):611-620
- Monchiero M, Piano S, & Gullino ML (1996) Evaluation of the activity of *Ampelomyces quisqualis* against *Uncinula necator* in central-northern Italy. Valutazione dell'attività di *Ampelomyces quisqualis* nei confronti di *Uncinula necator* nell'Italia centro-settentrionale. Informatore Fitopatologico 46(9):19-23
- Mostert L, Crous PW, Groenewald JZ, Gams W, Summerbell RC (2003) *Togninia* (Calosphaerales) is confirmed as teleomorph of *Phaeoacremonium* by means of morphology, sexual compatibility and DNA phylogeny. Mycologia 95: 646-659
- Mougel C, Offre P, Ranjard L, Corberand T, Gamalero E, Robin C, Lemanceau P (2006) Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different development stages of *Medicago truncata* Geartn Cv Jemalong line J5. New Phytol 170:165–175
- 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
- Mulligan DFC, Deacon JW (1992) Detection of presumptive mycoparasites in soil placed on host-colonized agar plates. Mycol Res 96:605-608
- Munkvold GP, Marois JJ (1993) Efficacy of natural epiphytes and colonizers of grapevine pruning wounds for biological control of *Eutypa dieback*. Phytopathol 83(6):624-629
- Musetti R, Vecchione A, Stringher L, Borselli S, Zulini L, Marzani C, et al. (2006) Inhibition of sporulation and ultrastructural alterations of grapevine downy mildew by the endophytic fungus *Alternaria alternata*. Phytopathol 96(7):689-698
- Nagegowda DA (2010) Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. FEBS letters 584(14):2965-2973
- Nascimento T, Rego C, Oliveira H (2007) Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk diseases. Phytopathol Mediterr 46:218–24
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT (2003) Nitric oxide signaling in plants. New Phytol 159:11-35
- Nigro F, Sialer MMF, Gallitelli D (1999) Transformation of *Metschnikowia pulcherrima* 320, biocontrol agent of storage rot, with the green fluorescent protein gene. Journal of Plant Pathol 81:205–8
- Nürnberg 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(4):318-324
- Nürnberg T, Nennstiel D, Jabs T, Sacks WR, Hahlbrock K, Scheel D (1994) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78(3):449-460
- Octave S, Amborabe BE, Luini E, Ferreira T, Fleurat-Lessard P, Roblin G (2005) Antifungal effects of cysteine towards *Eutypa lata*, a pathogen of vineyards. *Plant Physiology and Biochemistry* 43:1006–13
- Olivain C, Alabouvette C (1997) Colonization of tomato root by a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. *New Phytol* 137(3):481– 494
- Olivain C, Alabouvette C (1999) Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* in comparison with a non-pathogenic strain. *New Phytol* 141(3):497-510
- Olivain C, Humbert C, Nahalkova J, Fatehi J, L'Haridon F, Alabouvette C (2006) Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. *Appl Environ Microbiol* 72(2):1523-1531
- Onaindia M, Dominguez I, Albizu I, Garbisu C, Amezaga I (2004) Vegetation diversity and vertical structure as indicators of forest disturbance. *Forest Ecol Manag* 195: 341-354
- OIV <http://www.oiv.int/oiv/cms/index>
- Pajot E, Regnault-Roger C (2008) Stimulation des défenses naturelles des plantes et résistance induite : une nouvelle approche phytosanitaire ? In : Regnault-Roger C., Philogène B and Vincent C coord. *Biopesticides d'origine végétale – 2<sup>e</sup> édition*. Editions Tec & Doc, Paris, 337 pp
- Park CJ, Shin R, Park JM, Lee GJ, You JS, Paek KH (2002) Induction of pepper cDNA encoding a lipid transfer protein during the resistance response to tobacco mosaic virus. *Plant Mol Biol* 48 (3):243–254
- Paul B (1999a) *Pythium periplocum*, an aggressive mycoparasite of *Botrytis cinerea* causing the gray mould disease of grapevine. *FEMS Microbiol Let* 181(2):277-280
- Paul B (1999b) Suppression of *Botrytis cinerea* causing the grey mould disease of grapevine by an aggressive mycoparasite, *Pythium radiosum*. *FEMS Microbiol Let* 176(1):25-30
- Paul B (2004) A new species of *Pythium* isolated from burgundian vineyards and its antagonism towards *Botrytis cinerea*, the causative agent of the grey mould disease. *FEMS Microbiol Let* 234(2):269-274
- Paul B, Chereyathmanjiyil A, Masih I, Chapuis L, Benoit A (1998) Biological control of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grapevine and elicitation of stilbene

- phytoalexin (resveratrol) by a soil bacterium. *FEMS Microbiol Let* 165(1):65-70
- Paul B, Girard I, Bhatnagar T, & Bouchet P (1997) Suppression of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grape vine (*Vitis vinifera*) and its pectinolytic activities by a soil bacterium. *Microbiol Res* 152(4):413-420
- Perazzolli M, Dagostin S, Ferrari A, Elad Y, Pertot I (2008) Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. *Bio Con* 47(2):228-234.
- Perazzolli M, Dominici P, Romero-Puertas MC, Zago E, Zeier J, Sonoda M, Lamb C, Delledonne M (2004) Arabidopsis nonsymbiotic hemoglobin Ahb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* 16:2785-2794
- Perazzolli M, Roatti B, Bozza E, Pertot I (2011) *Trichoderma harzianum* T39 induces resistance against downy mildew by priming for defense without costs for grapevine. *Biol control* 58(1):74-82
- Péros JP, Jamaux-Despreaux I, Berger G (2000) Population genetics of fungi associated with esca disease in French vineyards. *Phytopathol Mediterr* 39: 150-155
- Pertot I, Dagostin S, Gobbin D (2007) Mechanism of action against *Plasmopara viticola* of the grapevine endophytic strain of the fungus *Alternaria alternata*. International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants West Palaearctic Regional Section: Working Group Integrated Control of Plant Pathogens. Proceedings of the Meeting Fundamental and Practice Approaches to Increase Biocontrol Efficacy Spa, Belgium, 6-10 September 2006, pp 189-193
- Picard K, Ponchet M, Blein JP, 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(1):379-395
- Picard K, Tirilly Y, Benhamou N (2000a) Cytological effects of cellulases in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. *Appl Environ Microbiol* 66(10):4305-4314
- Pitt WM, Sosnowski MR, Taylor A, Huang R, Quirk L, Hackett S, Somers A, Steel CC, Savocchia S (2010) Management of *Botryosphaeria* canker of grapevines. *Aus Viti Prac Vine Mana* 14:52-56
- Plaats-Niterink AJVd (1981) Monograph of the genus *Pythium*, Baarn, Netherlands
- Polesani M, Bortesi L, Ferrarini A, Zamboni A, Fasoli M, Zadra C, Polverari A (2010) General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible (*Vitis vinifera*) and a resistant (*V. riparia*) grapevine species. *BMC gen* 11(1):117

- Ponchet M, Panabieres F, Milat ML, Mikes V, Montillet JL, Suty L, Triantaphylides C, Tirilly Y, Blein JP (1999) Are elicitors cryptograms in plant-oomycete communications? *Cell Mol Life Sci* 56(11-12):1020-1047
- Postel S, Kemmerling B (2009) Plants systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 20 :1025-1031
- Postma J, van Veen JA (1990) Habitable pore space and survival of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* introduced into soil. *Microb Ecol* 19: 149–161
- Prost I, Dhondt S, Rothe G, Vicente J, Rodriguez J, Kift N, Carbonne F, Griffiths G, Esquerré-Tugayé MT, 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
- Raynal G, Ravise A, Bomperix G (1980) Action of aluminium tris-O-ethylphosphonate on pathogenicity of *Plasmopara viticola* and on stimulation of defence reactions of grapevine. *An Phytopathol* 12:163-175
- Redford AJ, Bowers RM, Knight R, Linhart Y, Fierer N (2010) The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environ Microbiol* 12:2885-2893
- Reglinski T, Elmer PAG, Taylor JT, Parry FJ, Marsden R, Wood PN (2005) Suppression of Botrytis bunch rot in Chardonnay grapevines by induction of host resistance and fungal antagonism. *Aus Plant Pathol* 34:481-8
- Reglinski T, Kingston C (2001) Biological control – the next generation of pest control agents? *Aust N Z Grape Wine* 454:106–9
- Regnault, H, De Sartre XA, Regnault-Roger C (2012) Les révolutions agricoles en perspective-Introduction. *Les révolutions agricoles en perspective* 13-22
- Rekanovic E, Milijasevic S, Todorovic B, Potocnik I (2007) Possibilities of biological and chemical control of *Verticillium wilt* in pepper. *Phytoparasit* 35(5):436-441
- Renault D, Vallance J, Déniel F, Wery N, Godon JJ, Barbier G, Rey P. (2012) Diversity of bacterial communities that colonize the filter units used for controlling plant pathogens in soilless cultures. *Microb ecol* 63:170-187
- Retief E, McLeod A, Fourie PH (2006) Potential inoculum sources of *Phaeoconiella chlamydospora* in South African grapevine nurseries. *Eur J Plant Pathol* 115:331-339
- Rey P, Benhamou N, Tirilly Y (1996) Ultrastructural and cytochemical studies of cucumber roots infected by two *Pythium* species with different modes of pathogenicity. *Physiol Mol Plant Pathol* 49(4):213-231
- Rey P, Benhamou N, Tirilly Y (1998b) Ultrastructural and cytochemical investigation of asymptomatic infection by *Pythium* spp. *Phytopathol* 88(3):234-244

- 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
- Rey P, Floch GI, Benhamou N, Tirilly Y (2008) *Pythium oligandrum* biocontrol: its relationships with fungi and plants. In: E. Ait Barka and C. Clément (eds) *Plant-microbe interactions*, Research Signpost, Kerala, India, pp 43-67
- Rey P, Le Floch G, Benhamou N, Salerno MI, Thuillier E, Tirilly Y (2005) Interactions between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and two types of sclerotia of plant-pathogenic fungi. *Mycol Res* 109:779-788
- Rey P, P Nodet, Y Tirilly (1997) *Pythium F* induce a minor but ubiquitous disease in tomato soilless cultures. *J Plant Pathol* 79:173-180
- Rey P, Picard K, Déniel F, Benhamou N, Tirilly Y (1999) Development of an IPM system in soilless culture by using slow filtration and a biocontrol fungus, *Pythium oligandrum*. In: Van Lenteren JC (ed) *Integrated control in glasshouses*, IOBC WPRS Bulletin, pp 205-208
- Ribeiro WRC, Butler EE (1992) Isolation of mycoparasitic species of *Pythium* with spiny oogonia from soil in California. *Mycol Res* 96:857-862
- Robertson MP, Kriticos DJ, Zacharades C (2008) Climate matching techniques to narrow the search for biological control agents. *Biol Control* 46:442-452
- Robotic V, Bosancic R, Mojic M (2002) Biological control of grapevine powdery mildew with Effective Microorganisms (EM). IOBC/WPRS Working Group 'Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens'. Proceedings of the 7th working group meeting, Influence of abiotic and biotic factors on biocontrol agents at Pine Bay, Kusadasi, Turkey, 22-25 May 2002.p 191
- Rodriguez MCS, Petersen M, Mundy J (2010) Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *An Rev Plant Biol* 61:621-649
- Rolshausen PE, Gubler WD (2005) Use of boron for the control of *Eutypa* dieback of grapevines. *Plant Dis* 89(7):734-738
- Rolshausen PE, Urbez-Torres JR, Rooney-Latham S, Eskalen A, Smith RJ, Gubler WD (2010) Evaluation of Pruning Wound Susceptibility and Protection Against Fungi Associated with Grapevine Trunk Diseases. *Am J Enol Vitic* 61:113-119
- Romanazzi G, Murolo S, Pizzichini L, Nardi S (2009) Esca in young and mature vineyards, and molecular diagnosis of the associated fungi. *Eur J Plant Pathol* 125: 277-290
- Rooney-Latham S, Eskalen A, Gubler WD (2005) Occurrence of *Togninia minima* perithecia in esca-affected vineyards in California. *Plant Dis* 89: 867-871

- 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(1):104
- Ruijter J, Ramakers C, Hoogaars W, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff M, Moorman A (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 37(6):45
- Ryals J, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD (1996) Systemic acquired resistance. *Plant cell* 8:1809-1819
- Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechn* 34(2):374-8
- Santoyo G, Orozco-Mosqueda MD, Govindappa M, 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Bioc Sci Tech* 22:855-72
- Savazzini F, Longa CMO, Pertot I (2009) Impact of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 on soil microbial communities of a vineyard in northern Italy. *Soil Biol Biochem* 41(7):1457-1465
- Sawant SD, Sawant IS, 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
- Schena L, Ippolito A, Zahavi T, Cohen L, Droby S (2000) Molecular approaches to assist the screening and monitoring of postharvest biocontrol yeasts. *Eur J Plant Pathol* 106(7):681-691
- Schena L, Ippolito A, Zahavi T, Cohen L, Nigro F, Droby S (1999) Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Post Biol Tech* 17(3):189-199
- Schena L, Nigro F, Soleti Ligorio V, Yaseen T, El Ghaouth A, Ippolito A (2004) Biocontrol activity of Bio-Coat and Biosure against postharvest rots of table grapes and sweet cherries. *Central Valley Postharvest Newsletter* 13, 10
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Sci* 270:467-70
- Schmidt CS, Wolf GA, Lorenz D, Jaèger J (2001) Biological control of the grapevine dieback fungus *Eutypa lata*, II.: influence of formulation additives, transposon mutagenesis on the antagonistic activity of *Bacillus subtilis*, *Erwinia herbicola*. *J Phytopathol* 149:437–

445

- Schmidt L, Ferreira JHS, Holz G (1996) Further evaluation of biocontrol of *Botrytis cinerea* by *Trichosporon pullulans* on table grapes. In: Proceedings of the XII International Botrytis Symposium, Wageningen, the Netherlands. Wageningen, the Netherlands: Pudoc Scientific Publishers, Abstract P43
- Schmitt A, Malathrakis N, Konstantinidou-Doltsinis S, Dik A, Ernst A, Francke W, Petsikos-Panayotarou N, Schuld M, Seddon B (2001) Improved plant health by the combination of biological disease control methods. IOBC/WPRS Working Group; Biological Control of Fungal and Bacterial Plant. Proceedings of the sixth meeting, Biocontrol Agents: Mode of Action and Interaction with Other Means of Control, Sevilla, Spain, November 30 - December 3, 2000, pp 29-32
- Schmitthenner AF (1962) Isolation of *Pythium* from soil particles. *Phytopathol* 52:1133-1138
- Schoonbeek H-J, Jacquat-Bovet A-C, Mascher F, Métraux J-P (2007) Oxalate-degrading bacteria can protect *Arabidopsis thaliana* and crop plants against *Botrytis cinerea*. *Mol Plant-Microbe Interact* 20:1535–1544
- Sendhilvel V, Marimuthu T, Samiappan R (2007). Talc-based formulation of *Pseudomonas fluorescens*-induced defense genes against powdery mildew of grapevine. *Archives of Phytopathol Plant Protec* 40(2):81-89
- Sesan T, Oprea M, Podosu Cristescu A, Tica C, 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
- Sessitsch A, Weilharter A, Gerzabek MH, Kirchmann H, Kandeler E (2001) Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl Environ Microbiol* 67:4215-4224
- Sharma RR, Singh D, Singh R (2009) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biol Control* 50(3):205-221
- Siebert JB (2001) *Eutypa*: the economic toll on vineyards. *Wines Vines*, April, 50-56
- Smyth GK (2005) Limma: linear models for microarray data. In: *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber (eds), Springer, New York, 2005
- Sohal AK, Pallas JA, Jenkins GI (1999) The promoter of a *Brassica napus* lipid transfer protein gene is active in a range of tissues and stimulated by light and viral infection in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 41(1):75–87
- Sosnowski MR, Creaser M, Wicks T (2004) Evaluating fungicides as pruning wound treatments to control *eutypa* dieback. *Aus N Z Grape Wine* 485:51–3
- Sosnowski MR, Creaser ML, Wicks TJ, Lardner R, Scott ES (2008) Protection of grapevine

- pruning wounds from infection by *Eutypa lata*. *Aus J Grape Wine Res* 14:134-142
- Sparapano L, Giovanni B, Graniti A (2000) Effects on plants metabolites produced in culture by *Phaeoacremonium chlamydosporum*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. *Phytopathol Mediterr* 39:169-177
- Spies CFJ, Mazzola M, McLeod A (2011) Characterisation and detection of *Pythium* and *Phytophthora* species associated with grapevines in South Africa. *Eur J Plant Pathol* 131:103-119
- Stassen JH, Van den Ackerveken G (2011) How do oomycete effectors interfere with plant life?. *Current opinion in plant biol* 14(4):407-414
- Stewart A, Antonov A, Trought M, Walter M (1998) Biological control of *Botrytis* bunch rot of grapes using naturally occurring fungal antagonists. In: Proceedings of the 7th International Congress of Plant Pathology, Edinburgh, UK. (Abstract 73)
- Strobel GA, Morrison SL, Cassella M (2005) Protecting plants from oomycete pathogens by treatment with compositions containing Serratamolide and Oocydin A from *Serratia marcescens*. US Patent US006926892B2
- Surico G, Mugnai L, Marchi G, (2006) Older and more recent observations on esca: a critical review. *Phytopathol Mediterr* 45:S68-S86
- Tabacchi R, Fkyerat A, Poliat C, Dubin GM (2000) Phytotoxins from fungi of esca of grapevine. *Phytopathol Mediterr* 39:156-161
- Taiz L, Zeiger E (1998) Auxins. In: Taiz L, Zeiger E (eds) *Plant physiology*. Sinauer Associates, Sunderland, pp 543-589
- Takahashi, H., Ishihara, T., Hase, S., Chiba, A., Nakaho, K., Arie, T., Teraoka, T., Iwata, M., Tugane, T. et al. (2006) Beta-cyanoalanine synthase as a molecular marker for induced resistance by fungal glycoprotein elicitor and commercial plant activators. *Phytopathol* 96:908–916
- Takeda N, Kistner C, Kosuta S, Winzer T, Pitzschke A, Groth M, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Parniske M (2007) Proteases in plant root symbiosis. *Phytochem* 68:111–121
- Takenaka S, Ishikawa S (2013) Biocontrol of sugar beet seedling and taproot diseases caused by *Aphanomyces cochlioides* by *Pythium oligandrum* treatments before transplanting. *Jpn Agric Res Quarter* 47(1):75-83
- 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(5):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*. *Phytopathol* 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. *Phytopathol* 98(2):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(5):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* 168:972-9
- Tegli S, Santilli E, Bertelli E, Surico G (2000) Genetic variation within *Phaeoacremonium aleophilum* and *P. chlamydosporum* in Italy. *Phytopathol Mediterr* 39: 125-133
- Tello ML, Gramaje D, Gomez A, Abad-Campos P, Armengol J (2010) Analysis of phenotypic and molecular diversity of *Phaeoacremonium chlamydosporum* isolates in Spain. *J Plant Pathol* 92:195-203
- Tena G, Boudsocq M, Sheen J (2011) Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Current opinion in plant biol* 14(5):519-529
- Tenhaken R, Levine A, Brisson LF, Dixon RA, Lamb C (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 91:4158-4163
- Terral JF, Tabard E, Bouby L, Ivorra S, Pastor T, Figueiral I, et al (2010). Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. *Ann Bot* 105(3):443-455
- Theocharis A, Bordiec S, Fernandez O, Paquis S, Dhondt-Cordelier S, Baillieul F, Clement C, Barka EA (2010) Priming *Vitis vinifera* L. with plant growth promoting Burkholderia phytofirmans strain PsJN enhances its acclimation to low non-freezing temperatures. *IOBC/WPRS Bulletin* 78:28-28
- Thiel J, Rolletschek H, Friedel S, Lunn J, Nguyen T, Feil R, Tschiersch H, Müller M, Borisjuk L (2011) Seed-specific elevation of non-symbiotic hemoglobin AtHb1: beneficial effects and underlying molecular networks in *Arabidopsis thaliana*. *BMC plant biol* 11(1):48
- Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller LA, Rhee SY, Stitt M (2004) Mapman: a user driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J* 37(6):914-939

- This P, Lacombe T, Thomas MR (2006) Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *TRENDS in Genetics* 22(9):511-519
- Tholl D (2006) Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biol* 9:297–304
- Thomma B, Eggermont K, Tierens K, Broekaert WF (1999) Requirement of functional ethylene-insensitive 2 genes for efficient resistance of *Arabidopsis* in infection by *Botrytis cinera*. *Plant Physiol* 121:1093-1101
- Thomson JN (1999) Coevolution and escalation: are ongoing coevolutionary meanderings important? *American Naturalist* 153:S92-S93
- Thuerig B, Binder A, Boller T, Guyer U, Jiménez S, Rentsch C, Tamm L (2006) An aqueous extract of the dry mycelium of *Penicillium chrysogenum* induces resistance in several crops under controlled and field conditions. *Eur J Plant Pathol* 114(2):185-197
- Tian M, Benedetti B, Kamoun S (2005) A second kazal-like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. *Plant Physiol* 138:1785–1793
- Tian M, Huitema E, da Cunha L, Torto-Alalibo T, Kamoun S (2004) A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *J Biol Chem* 279:26370–26377
- Tian M, Kamoun S (2005) A two disulfide bridge Kazal domain from *Phytophthora* exhibits stable inhibitory activity against serine proteases of the subtilisin family. *BMC Biochem* 6:15
- Tilcher R, Schmidt C, Lorenz D, Wolf GA (2002) About the use of antagonistic bacteria and fungi. In 10th International Conference on Cultivation Technique atakkend Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing and Viticulture. Proceedings of a conference, Weinsberg, Germany, 4-7 February. pp.142-145
- Ton J, Mauch-Mani B (2004) Beta-amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA- dependent priming for callose. *Plant J* 38:119–130
- Torres MA, Jones JDG, Dangl JL (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol* 141:373-378
- Trotel-Aziz P, Aziz A, Magnin-Robert M, Aït Barka E, Gogniès S (2006) Bactéries présentant une activité protectrice de la vigne contre *Botrytis cinerea*. French patent 06.06.513
- Trotel-Aziz P, Couderchet M, Biagiatti 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
- Tuao Gava CA, Leal Menezes ME (2012) Efficiency of *Trichoderma* sp isolates on the

- control of soil-borne pathogens in the yellow melon. *Revista Ciencia Agronomica* 43:633-640
- Turner JG, Ellis C, Devoto A (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell* 14:153-164
- Vaartaja O, Bumbieris M (1964) Abundance of *Pythium* species in nursery soils in South Australia. *Aust J Biol Sci* 17:436-445
- Valamoti SM, Mangafa M, Koukouli-Chrysanthaki C, Malamidou D (2007) Grape-pressings from northern Greece: the earliest wine in the Aegean? *Antiquity* 81:54–61
- 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(9):1124-1134
- Vallance J, Le Floch G, Deniel F, Barbier G, Levesque CA, Rey P (2009) Influence of *Pythium oligandrum* biocontrol on fungal and oomycete population dynamics in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 75(14):4790-4800
- Van Helden M (2008) Protection intégrée: La protection intégrée vis-à-vis des ravageurs de la vigne. In: Kreiter S (ed) *Ravageurs de la vigne*. Féret, France, pp 321–335
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *An Rev Phytopathol* 44:135-162
- Van Loon LC, Van Strien EA (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 55:85-97
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3:34-40.
- Veloso J, Diaz J (2012) *Fusarium oxysporum* Fo47 confers protection to pepper plants against *Verticillium dahliae* and *Phytophthora capsici*, and induces the expression of defence genes. *Plant Pathol* 61(2):281-288
- Verhagen BW, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, Van Loon LC, Pieterse CM (2004) The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. *Mol Plant Microbe Interact* 17(8):895-908
- Verhagen BWM, 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
- Verhagen BWM, Trotel-Aziz P, Jeandet P, Baillieul F, Aziz A (2011) Improved resistance against *Botrytis cinerea* by grapevine-associated bacteria that induce a prime oxidative burst and phytoalexin Production. *Phytopathol* 101:768–777

- Vesely D (1977) Potential biological control of damping-off pathogens in emerging sugar beet by *Pythium oligandrum* Drechsler. *Journal of Phytopathology*. 90:113-115
- Vesely D (1989) Biological control of damping-off pathogens by treating seed with a powdery preparation of the mycoparasite *Pythium oligandrum* in large scale field trials. In: *Interrelations Between Microorganisms and Plants in Soil*. Vancura V and Kunc F, eds. Academia, Czechoslovak Academy of Sciences, Praha, pp. 445-449
- Viala P, (1926) Recherches sur les maladies de la vigne Esca. *Annal Epiphyt fasc 1* :1-108
- Viebahn M, Veenman C, Wernars K, van Loon LC, Smit E, Bakker PAHM (2005) Assessment of differences in ascomycete communities in the rhizosphere of field-grown wheat and potato. *FEMS Microbiol Ecol* 53:245–253
- Vignes V, Yobregat O, Barthélémy B, Dias F, Coarer M, Girardon K, *et al.* (2010) Wood decay diseases: tests of disinfection methods in French nursery. *Phytopathol Mediterr* 49:130-131
- Vollenweider S, Weber H, Stolz S, Chételat A, Farmer EE (2000) Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes : Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased Arabidopsis leaves. *Plant J* 24:467-476
- Vranova E, Coman D, Grussem W (2012) Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. *Mol Plant* 5:318–333
- Waite H, Morton L (2007) Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material. *Phytopathol Mediterr* 46:5-17
- Walla JA (1984) Incidence of *Phellinus punctatus* on living woody-plants in North Dakota. *Plant Dis* 68:252-253
- Walters D, Newton A, Lyon G (2007) Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection. Blackwell Publishing, Oxford UK, 258 pp.
- Walther D, Gindrat D, (1987) Biological control of *Phoma* and *Pythium* damping-off of sugar-beet with *Pythium oligandrum*. *J Phytopathol* 119:167-174
- Wasternack C, Hause B (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of botany* 111(6):1021-1058
- Weaver M, Vedenyapina E, Kenerley CM (2005) Fitness, persistence, and responsiveness of a genetically engineered strain of *Trichoderma virens* in soil mesocosms. *Appl Soil Ecol* 29(2):125-134
- Weber EA, Trouillas FP, Gubler WD (2007) Double pruning of grapevines: A cultural practice to reduce infections by *Eutypa lata*. *Am J Enol Vitic* 58:61-66
- Wendehenne D, Lamotte O, Frachisse J, Barbier-Brygoo H, Pugin A (2002) Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense

- responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell* 14:1937-1951
- Whipps JM, McQuilken MP (2001) Biocontrol activity of *Pythium oligandrum* and *Coniothyrium minitans* in pelleted and film-coated seed. Seed treatment Challenges & opportunities. BCPC Symposium Proceedings No. 76, pp 127-134
- White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J (1990) Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes In: PCR protocols: a guide to methods and applications Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), New York, Academic Press, 315-322 pp
- Whitelaw-Weckert MA, Rahman L, Hutton RJ, Coombes N (2007) Permanent swards increase soil microbial counts in two Australian vineyards. *Appl Soil Ecol* 36:224-232
- Whiteman SA, Jaspers M, Stewart A, Ridgway JJ (2004) *Phaeoemoniella chlamydospora* detection in the grapevine propagation process by species-specific PCR. *Phytopathol Mediterr* 43:156
- Whiteman SA, Jaspers M, Stewart A, Ridgway JJ (2005) Infested soil as a source of inoculum for *Phaeoemoniella chlamydospora*, causal agent of Petri disease. *Phytopathol Mediterr* 44:105-106
- Whiteman SA, Stewart A (1998) Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation on irradiated grape leaf tissue by the antagonistic bacterium *Serratia liquefaciens*. *N Z J Crop Horti Sci* 26(4):325-330
- Wicks T, Davies K (1999) The effect of *Eutypa* on grapevine yield. *Australian Grapegrower Winemaker* 426:15-16
- Wiermer M, Feys BJ, Parker JE (2005) Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current opinion in plant biol* 8(4):383-389
- Wittstock U, Gershenzon J (2002) Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Cur Op Plant Biol* 5:300-307
- Wulff EG, Pham ATH, 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(1):69-76
- Xiong L, Zhu JK (2001) Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives. *Physiol Planta* 112:152-166
- Xu XM, Jeffries P, Pautasso M, Jeger MJ (2011a) A numerical study of combined use of two biocontrol agents with different biocontrol mechanisms in controlling foliar pathogens. *Phytopathol* 101(9):1032-1044
- Xu XM, Jeffries P, Pautasso M, Jeger MJ (2011b) Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathol* 101(9):1024-1031

- Xu XM, Salama N, Jeffries P, Jeger MJ (2010) Numerical studies of biocontrol efficacies of foliar plant pathogens in relation to the characteristics of a biocontrol agent. *Phytopathol* 100(8):814-821
- Yedidia I, Benhamou N, Chet I (1999) Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol* 65(3):1061– 1070
- Yilmaz Y, Toledo RT (2004) Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *J Agric Food Chem* 52:255–260
- Zahavi T, Cohen L, Weiss B, Schena L, Daus A, Kaplunov T, Zutkhi J, Ben-Arie R, Droby S (2000) Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. *Post Biol Tech* 20(2):115-124
- Zanzotto A, Bellotto D, Borgo M (2005) Efficacy of AQ10 against powdery mildew and effects on cleistothecia formation in vineyard. *Efficacia antioidica di AQ10 ed effetti sulla formazione di cleistoteci in vigneto*. *Informatore Fitopatologico* 55(7/8):68-76
- Zecca G, Abbott JR, Sun WB, Spada A, Sala F, Grassi F (2012) The timing and th mode of evolution of wild grapes (*vitis*). *Mol Phylogenet Evol* 62(2):736-747
- Zhang G, Chen M, Li L, Xu Z, Chen X, Guo, J, Ma Y (2009) Overexpression of the soybean GmERF3 gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. *J Exp Bot* 60(13):3781-3796
- Zhang SQ, Klessig DF (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science* 6:129-136
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 23(4):283-333
- Ziedan E-SH, El-Mohamedy RSR (2008) Application of *Pseudomonas fluorescens* for controlling root-rot disease of grapevine. *Res J Agric Biol Sci* 4:346–353
- Ziedan ESH, Farrag ES, El-Mohamedy RS, Abd Alla MA (2010) *Streptomyces alni* as a biocontrol agent to root-rot of grapevine and increasing their efficiency by biofertilisers inocula. *Arch Phytopathol Plant Prot* 43:634–646
- Zinger L, Gury J, Giraud F, Krivobok S, Gielly L, Taberlet P, Geremia RA (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
- Zumstein E., Moletta R, Godon JJ (2000) Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Envir Microbiol.* 2:69-78





# Annexes

## Annexe 1

Gènes des sous-catégories fonctionnelles des BHLH, de la voie de signalisation du calcium et des récepteurs kinases différentiellement exprimés chez la vigne, au niveau racinaire, en présence de *P. oligandrum*, entre 7 et 21 jours post inoculation.

Catégorie ou sous-catégorie fonctionnelle	Gène	Description Mapman	Niveau d'expression
<i>RNA.regulation of transcription.bHLH,Basic Helix-Loop-Helix family</i>	chr7_jgvv205_2_t01	not_assigned	3,97
	chr5_jgvv20_450_t01	not_assigned	3,82
	chr17_jgvv1314_1_t01	not_assigned	3,18
	chr17_jgvv824_2_t01	not_assigned	3,02
	chr17_jgvv927_1_t01	similar to GB AAL16298,1 16226919 AF428368 AT4g16430/dl4240w {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (26%)	2,45
	chr17_gsvivt00006476001_t01	not_assigned	1,69
	chr17_jgvv0_396_t01	similar to GB AAO23611,1 27764980 BT003046 At1g74500 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (73%)	1,35
<i>signalling,calcium</i>	chr9_jgvv2_719_t01	similar to UP Q7FZ95_EUCGR (Q7FZ95) Calcineurin-like protein, complete	-1,29
	chr4_jgvv8_85_t01	similar to UP CNCB10_ARATH (Q7FRS8) Calcineurin B-like protein 10, partial (85%)	-1,24
	chr19_jgvv14_147_t01	similar to UP Q9MAH9_ARATH (Q9MAH9) F12M16,12, partial (28%)	0,97
	chr14_jgvv30_14_t01	similar to UP Q3E8V7_ARATH (Q3E8V7) Protein At5g28830, partial (52%)	0,99
	chr6_jgvv9_162_t01	homologue to GB AAA33705,1 169205 PETCALPRO calmodulin-related protein {Petunia x hybrida} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (85%)	1,22
	chr5_jgvv102_41_t01	similar to UP Q9SCA1_LOTJA (Q9SCA1) Calcium-binding protein, partial (63%)	1,28
	chr17_jgvv463_3_t01	not_assigned	1,46
	chr17_jgvv516_2_t01	similar to UP Q9LTR4_ARATH (Q9LTR4) Similarity to EH domain containing proteins, partial (33%)	1,56
	chr14_jgvv30_20_t01	similar to RF NP_188931,1 15228891 NM_113191 calcium-transporting ATPase/ calmodulin binding {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0) , partial (24%)	1,58

chr17_jgvv0_779_t01	not_assigned	3,03
chr5_jgvv20_414_t01	homologue to UP Q39890_SOYBN (Q39890) Calmodulin, complete	1,59
chr12_jgvv28_141_t01	similar to UP Q9MAH9_ARATH (Q9MAH9) F12M16,12, partial (28%)	1,62
chr9_jgvv2_414_t01	similar to RF NP_974673,2 79610240 NM_202944 calmodulin binding {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (63%)	1,68
chr8_jgvv32_96_t01	not_assigned	1,68
chr5_jgvv77_18_t01	weakly similar to UP Q9FDX6_ARATH (Q9FDX6) NaCl-inducible Ca <sup>2+</sup> -binding protein-like; calmodulin-like (AT5g49480/K6M13_2) (AT5g49480), partial (78%)	1,74
chr5_jgvv77_56_t01	weakly similar to UP Q9FDX6_ARATH (Q9FDX6) NaCl-inducible Ca <sup>2+</sup> -binding protein-like; calmodulin-like (AT5g49480/K6M13_2) (AT5g49480), partial (78%)	1,85
chr5_jgvv77_10_t01	weakly similar to UP Q9FDX6_ARATH (Q9FDX6) NaCl-inducible Ca <sup>2+</sup> -binding protein-like; calmodulin-like (AT5g49480/K6M13_2) (AT5g49480), partial (78%)	1,87
chr1_jgvv10_221_t01	not_assigned	2,01
chr19_jgvv14_145_t01	similar to UP Q93ZH7_ARATH (Q93ZH7) AT5g03040/F15A17_70, partial (43%)	2,05
chr12_jgvv59_40_t01	weakly similar to UP Q852G4_ORYSA (Q852G4) Expressed protein, partial (62%)	2,22
chr14_jgvv6_74_t01	weakly similar to UP ALL8_OLEEU (Q9M7R0) Calcium-binding allergen Ole e 8 (PCA18/PCA23), partial (76%)	2,26
chr12_jgvv59_39_t01	weakly similar to UP Q852G4_ORYSA (Q852G4) Expressed protein, partial (62%)	2,28
chr12_jgvv59_33_t01	weakly similar to UP Q852G4_ORYSA (Q852G4) Expressed protein, partial (62%)	2,41
chr12_jgvv59_37_t01	weakly similar to UP Q852G4_ORYSA (Q852G4) Expressed protein, partial (62%)	2,47
chr17_jgvv0_626_t01	similar to UP Q9FJI9_ARATH (Q9FJI9) Similarity to calmodulin-binding protein, partial (46%)	2,48
chr12_jgvv59_32_t01	weakly similar to UP Q852G4_ORYSA (Q852G4) Expressed protein, partial (62%)	2,56
chr12_jgvv59_30_t01	weakly similar to UP Q852G4_ORYSA (Q852G4) Expressed protein, partial (62%)	2,59
<i>signalling,receptor kinases,Catharanthus roseus-like RLK1</i> chr14_jgvv68_2_t01	not_assigned	2,34

	chr14_jgvv68_6_t01	weakly similar to UP Q3E8W4_ARATH (Q3E8W4) Protein At5g28680, partial (8%)	1,36
<i>signalling,receptor kinases,DUF 26</i>	chrnun_jgvv650_3_t01	weakly similar to RF NP_194047,2 42567050 NM_118445 kinase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (9%)	2,51
	chr2_jgvv87_1_t01	weakly similar to RF NP_194047,2 42567050 NM_118445 kinase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (9%)	2,14
	chr2_jgvv87_2_t01	weakly similar to RF NP_194047,2 42567050 NM_118445 kinase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (9%)	1,90
<i>signalling,receptor kinases,leucine rich repeat III</i>	chr8_jgvv58_87_t01	not_assigned	3,17
	chr4_jgvv8_111_t01	similar to RF NP_181196,1 15227998 NM_129213 ATP binding {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (49%)	2,63
<i>signalling,receptor kinases,leucine rich repeat III</i>	chr8_jgvv7_457_t01	similar to RF NP_181196,1 15227998 NM_129213 ATP binding {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (49%)	2,51
	chr10_jgvv3_433_t01	not_assigned	1,64
	chr1_jgvv11_106_t01	similar to UP Q9LP77_ARATH (Q9LP77) T1N15,9, partial (52%)	1,62
	chr6_jgvv9_185_t01	similar to UP Q9LEA2_ARATH (Q9LEA2) Receptor protein kinase-like (Fragment), partial (66%)	1,44
<i>signalling,receptor kinases,leucine rich repeat VIII,2</i>	chr4_jgvv8_518_t01	weakly similar to UP Q6EQG8_ORYSA (Q6EQG8) Leucine-rich repeat family protein /protein kinase family protein-like, partial (16%)	2,07
<i>signalling,receptor kinases,leucine rich repeat XI</i>	chr18_jgvv72_30_t01	not_assigned	3,44
	chr8_jgvv7_54_t01	weakly similar to UP Q9FGL5_ARATH (Q9FGL5) Receptor protein kinase, partial (25%)	1,83
	chrnun_gsvivt00005145001_t01	similar to UP Q9M7W9_ARATH (Q9M7W9) MJK13,7 protein, partial (66%)	1,05
<i>signalling,receptor kinases,leucine rich repeat XII</i>	chr16_jgvv50_111_t01	weakly similar to UP Q9ZTK0_LYCES (Q9ZTK0) Hcr2-0A, partial (22%)	1,82
	chrnun_gsvivt00002252001_t01	not_assigned	1,63
<i>signalling,receptor kinases,leucine rich repeat XII</i>	chr18_jgvv89_67_t01	weakly similar to UP Q9ZTK0_LYCES (Q9ZTK0) Hcr2-0A, partial (22%)	1,06
<i>Signalling.receptor kinases.misc</i>	chrnun_jgvv262_9_t01	not_assigned	2,82
	chr7_jgvv5_573_t01	similar to UP Q9MA13_ARATH (Q9MA13) F20B17,5, partial (23%)	2,45

	chr14_jgvv108_33_t01	similar to UP Q75WU3_POPNI (Q75WU3) Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase 1, partial (28%)	2,43
	chr16_jgvv98_148_t01	similar to UP Q9M574_ORYSA (Q9M574) Receptor-like protein kinase, partial (25%)	2,39
	chr3_jgvv63_19_t01	similar to UP Q9MA13_ARATH (Q9MA13) F20B17.5, partial (23%)	2,26
	chr13_jgvv73_11_t01	weakly similar to RF NP_172891.1 15223744 NM_101306 ATP binding {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (19%)	2,21
	chr13_jgvv2254_1_t01	weakly similar to UP Q9FF29_ARATH (Q9FF29) Receptor serine/threonine kinase, partial (35%)	2,13
	chr4_jgvv8_23_t01	not_assigned	1,97
	chr13_jgvv258_8_t01	weakly similar to UP Q9FF29_ARATH (Q9FF29) Receptor serine/threonine kinase, partial (35%)	1,82
	chr14_jgvv68_1_t01	similar to UP Q9SCZ4_ARATH (Q9SCZ4) Receptor-protein kinase-like protein, partial (27%)	1,60
	chr14_jgvv66_246_t01	similar to UP Q75WU3_POPNI (Q75WU3) Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase 1, partial (28%)	1,59
	chr12_jgvv35_188_t01	similar to UP Q75WU3_POPNI (Q75WU3) Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase 1, partial (28%)	1,59
	chr17_jgvv0_715_t01	similar to UP Q75WU3_POPNI (Q75WU3) Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase 1, partial (12%)	1,56
	chr1_jgvv11_234_t01	similar to UP O49206_ORYSA (O49206) Receptor-like protein kinase (Fragment), partial (38%)	1,30
	chr3_jgvv63_234_t01	homologue to UP Q7Y229_ARATH (Q7Y229) At1g56720, partial (51%)	1,27
	chr18_jgvv122_98_t01	not_assigned	1,26
	chr12_jgvv28_227_t01	weakly similar to UP RIPK2_MOUSE (P58801) Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 , partial (5%)	1,25
	chr13_jgvv373_3_t01	similar to UP Q6J332_PYRPY (Q6J332) Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, partial (31%)	1,22
	chr14_jgvv83_27_t01	similar to UP Q6ZIG4_ORYSA (Q6ZIG4) Receptor protein kinase PERK1-like protein, partial (82%)	1,20
	chr7_random_jgvv272_8_t01	not_assigned	-1,14
	chr13_jgvv19_286_t01	similar to RF NP_195827.1 15241674 NM_120285 kinase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (39%)	-1,36
<i>signalling.receptor kinases.S-locus glycoprotein like</i>	chr15_jgvv24_17_t01	similar to UP O81906_ARATH (O81906) Serine/threonine kinase-like protein, partial (20%)	2,63
	chr19_jgvv15_195_t01	similar to UP O81906_ARATH (O81906) Serine/threonine kinase-like protein, partial (20%)	2,44

---

	chr19_jgvv14_366_t01	weakly similar to UP Q40101_IPOTF (Q40101) Receptor protein kinase 2 (Fragment), partial (28%)	1,73
<i>signalling.receptor kinases.wall associated kinase</i>	chr18_random_jgvv82_10_t01	not_assigned	2,44
	chr18_random_jgvv82_15_t01	not_assigned	2,28
	chr18_jgvv1_818_t01	not_assigned	1,08
<i>signalling.receptor kinases.wheat LRK10 like</i>	chr1_jgvv26_121_t01	not_assigned	1,45
	chr17_pdvv0_605_t01	not_assigned	-1,55

---

## Annexe 2

Catégories et sous-catégories fonctionnelles différentiellement exprimées chez la vigne, au niveau du tronc, en présence de *P. oligandrum*, entre 7 et 21 jours post inoculation.

Bin	Catégorie fonctionnelle	Nombre de gènes	p-value
2	major CHO metabolism		
2.2	major CHO metabolism.degradation		
2.2.1	major CHO metabolism.degradation.sucrose		
2.2.1.3	major CHO metabolism.degradation.sucrose.invertases		
2.2.1.3.1	major CHO metabolism.degradation.sucrose.invertases.neutral	1	0,27
3	minor CHO metabolism		
3.2	minor CHO metabolism.trehalose		
3.2.3	minor CHO metabolism.trehalose.potential TPS_TPP	1	0,12
17	hormone metabolism		
17.6	hormone metabolism.gibberelin		
17.6.1	hormone metabolism.gibberelin.synthesis-degradation		
17.6.1.11	hormone metabolism.gibberelin.synthesis-degradation.GA20 oxidase	1	0,09
20	stress		
20.2	stress.abiotic		
20.2.1	stress.abiotic.heat	2	0,18
26	misc		
26.1	misc.cytochrome P450	1	0,15
27	RNA		
27.3	RNA.regulation of transcription	2	0,13
27.3.11	RNA.regulation of transcription.C2H2 zinc finger family	1	0,39
27.3.26	RNA.regulation of transcription.MYB-related transcription factor family	1	0,23
29	protein		
29.5	protein.degradation		
29.5.11	protein.degradation.ubiquitin		
29.5.11.4	protein.degradation.ubiquitin.E3		
29.5.11.4.2	protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	1	0,33
30	signalling		
30.3	signalling.calcium	1	0,23
34	transport	2	0,41
34.16	transport.ABC transporters and multidrug resistance systems	1	0,86
34.99	transport.misc	1	0,33
35	not assigned		
35.1	not assigned.no ontology	2	0,87
35.2	not assigned.unknown	8	0,96
35.3	not assigned.new	4	0,58

# CURRICULUM VITAE

## Publications internationales à comité de lecture

1. **GERBORE J.**, VALLANCE J., YACOUB A., DELMOTTE F., GRIZARD D., REGNAULT-ROGER C. and REY P. Population structure of the oomycete, *P. oligandrum*, is not shaped by abiotic and biotic factors in the vineyards (soumise à la revue *Applied and Environmental Microbiology*).
2. BRUEZ E., VALLANCE J., **GERBORE J.**, LECOMTE P., GUERIN- DUBRANA L. and REY P. Analyses of the fungal communities that colonize the wood tissues of esca-symptomatic and asymptomatic grapevines (soumise à la revue *Applied and Environmental Microbiology*).
3. **GERBORE J.**, BENHAMOU N., VALLANCE J., LE FLOCH G., GRIZARD D., REGNAULT-ROGER C. and REY P. 2013. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environmental Science and Pest Management* (DOI 10.1007/s11356-013-1807-6).
4. BENHAMOU N., Le FLOCH G., VALLANCE J., **GERBORE J.**, GRIZARD D., and REY P. 2012. *Pythium oligandrum*: an example of opportunistic success. *Microbiology SGM*, 158:2679-2694.

## Chapitre d'ouvrage

1. **GERBORE J.**, BRUEZ E., VALLANCE J., GRIZARD D., REGNAULT-ROGER C. and REY P. 2013. Protection of grapevines by *Pythium oligandrum* strains isolated from Bordeaux vineyards against powdery mildew. In S. Compant, F. Mathieu eds, « *Recent advances on biocontrol of grapevine diseases: from fundamental knowledge to application in the vineyards* », Oenoplurimedia (sous presse).

## Actes de congrès

1. **GERBORE J.**, BENHAMOU N., VALLANCE J., LE FLOCH G., GRIZARD D. et REY P. 2013. Avantages et limites des micro-organismes utilisés en lutte biologique. Exemple de l'oomycète, *Pythium oligandrum*. *Actes du 42<sup>ème</sup> édition du Congrès annuel du Groupe Français des Pesticides* (sous presse).
2. **GERBORE J.**, BRUEZ E., VALLANCE J., GRIZARD D., REGNAULT-ROGER C. and REY P. 2011. Protection against a vine trunk attack by *Phaeomoniella chlamydospora* is concomitant with root colonization by the oomycete, *Pythium oligandrum*. *Multitrophic Interactions in Soil. IOBC/wprs Bulletin*, Vol. 71, 31-35.

## Autres

1. **GERBORE J.**, YACOUB A., BENHAMOU N., BARKA E.A., FONTAINE F., and P. REY. 2013. Des micro-organismes pour protéger les cultures. *Biofutur*, 343:43-45.

## Communications à des congrès parues dans des journaux avec Facteur d'Impact (IF):

1. BRUEZ E., VALLANCE J., **GERBORE J.**, LECOMTE P., GUERIN-DUBRANA L. and REY P., 2011. Characterization of endophytic microflora colonizing wood tissues of healthy and Esca-diseased vines. APS-IPPC Joint Meeting 2011, August 6-10. Honolulu, Hawaï, USA. *Phytopathology*, Vol. 101, 6:S26.
2. **GERBORE J.**, BRUEZ E., VALLANCE J., MASSOT M., GRIZARD D., REGNAULT-ROGER C. and P. REY. 2011. Characterization of biocontrol strains of *Pythium oligandrum* and control of an Esca pathogenic fungus attack. APS-IPPC Joint Meeting 2011, August 6-10. Honolulu, Hawaï, USA. *Phytopathology*, Vol. 101, 6:S21-S22.
3. **GERBORE J.**, VALLANCE J., NOVOA T., LECOMTE P., GUERIN-DUBRANA L. and REY P. 2010. Molecular and cultural approaches to characterize the microflora that colonizes wood tissues from vines affected by esca. *7<sup>th</sup> International Workshop on Grapevine Trunk Diseases*, 17-21 Janvier, Santa Cruz, Chili. *Phytopathologia Mediterranea*, 49:103-133.

## Communications lors de congrès, autres

(\* = communications orales personnellement présentées)

1. **GERBORE J.**, MAGNIN N., BRUEZ E., YACOUB A., GRIZARD D., REGNAULT-ROGER C. et 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 (communication orale)\*.
2. **GERBORE J.**, MAGNIN N., BRUEZ E., VALLANCE J., GRIZARD D., REGNAULT-ROGER C. and REY P. 2012. Control of a fungus involved in grapevine trunk disease (Esca) by using the oomycete, *Pythium oligandrum*: analysis of the induced resistance. *IOBC/WPRS Working Group on "Biocontrol of plant pathogens in sustainable agriculture"*. 24-27 Juin, Reims, France (communication orale)\*.
3. BRUEZ E., VALLANCE J., **GERBORE J.**, LECOMTE P., GUERIN- DUBRANA L. and REY P. 2012. Endophytic microflora of wood tissues of healthy and trunk diseased-grapevines. *8<sup>th</sup> International Workshop on « Grapevine Trunk Diseases »*, 18-21 Juin, Valencia, Espagne (communication orale).
4. **GERBORE J.**, MAGNIN N., BRUEZ E., VALLANCE J., GRIZARD D., REGNAULT-ROGER C., and REY P. 2012. Control of a fungus involved in grapevine trunk disease (Esca) by using the oomycete, *Pythium oligandrum*: analysis of the induced resistance. *8<sup>th</sup> International Workshop on « Grapevine Trunk Diseases »*, 18-21 Juin, Valencia, Espagne (communication orale)\*.
5. **GERBORE J.**, MAGNIN N., BRUEZ E., VALLANCE J., GRIZARD D., REGNAULT-ROGER C. and REY P. 2012. Utilisation de *Pythium oligandrum* pour lutter contre *Phaeomoniella chlamydospora*, un agent pathogène impliqué dans l'Esca, une maladie du bois de la vigne. *8<sup>ème</sup> colloque de la Société Française de Phytopathologie*, 5 au 8 juin, Paris, France (communication orale) \*.

6. REY P., **GERBORE J.**, VALLANCE J., GRIZARD D., and BENHAMOU N. 2012. Aperçu des avantages et limites de la lutte biologique via l'utilisation de l'oomycète, *Pythium oligandrum*. 42<sup>ème</sup> édition du Congrès annuel du Groupe Français des Pesticides, 30-31 mai et 1 juin, Poitiers, France (communication orale).
7. **GERBORE J.**, MAGNIN N., BRUEZ E., ROUXEL M., GRIZARD D., REGNAULT-ROGER C. and REY P. 2012. Analysis of the plant pathogenic resistance induced in vines after the root colonization by *Pythium oligandrum*. Macrowine "Marcovision of viticulture wine marking and markets. 18-21 June, Bordeaux, France (Poster).
8. BRUEZ E., VALLANCE J., **GERBORE J.**, LECOMTE P., GUERIN-DUBRANA L. and REY P. 2011. Characterization of fungal and bacterial communities that colonise the various wood tissues of healthy and esca-diseased vines. IOBC/WPRS Working Group on "Integrated Protection and Production in Viticulture", 2-5 Octobre, Lacanau, France (Poster).
9. **GERBORE J.**, BRUEZ E., VALLANCE J., GRIZARD D., REGNAULT-ROGER C. and REY P. 2011. Protection against a vine trunk attack by *Phaeomoniella chlamydospora* is concomitant with root colonization by the oomycete, *Pythium oligandrum*. International Symposium Biocontrol of Grapevine Diseases, 26-27 Mai, Toulouse, France (Poster).
10. **GERBORE J.**, BRUEZ E., VALLANCE J., GRIZARD D., REGNAULT-ROGER C. and REY P. 2011. Protection against a vine trunk attack by *Phaeomoniella chlamydospora* is concomitant with root colonization by the oomycete, *Pythium oligandrum*. IOBC/WPRS Working Group "Multitrophic interactions in soil", 4-7 April Cordoba, Espagne (Poster).
11. **GERBORE J.**, MASSOT M., DUFOUR M.C., CORIO-COSTET M.F., GRIZARD D., REGNAULT-ROGER C. and REY P. 2011. *Pythium oligandrum*, a new biocontrol agent of grapevine diseases. IOBC/WPRS Working Group on "Integrated Protection and Production in Viticulture", 2-5 Octobre, Lacanau, France (Poster).



# Abstract

Biocontrol research based on the use of microorganisms is expanding very rapidly. However, the use of such biocontrol agents is still too inconsistent to effectively protect plants in field applications. This phenomenon is often attributed to the non-persistence of biocontrol agents in the rhizosphere or on the plants. In order to reduce the risk of this happening, one solution consists in using microorganisms that are isolated from the plants needing protection.

In this thesis, an oomycete called *Pythium oligandrum*, which colonizes the rhizosphere of many plants, including grapevine, was assessed for the control of esca, a grapevine trunk disease for which no control method is currently available.

*P. oligandrum* strains have been isolated from the rhizosphere of vines cultivated in 3 wine-growing regions (12 grapevines) of Bordeaux with different types of soil: stony-sandy, silty and stony. Analyses of fungal and bacterial communities using a molecular fingerprinting method (Single Strand Conformation Polymorphism) showed that, unlike bacteria, the fungal species varied according to the sampling region. Roots of all the vines sampled were colonized by echinulated-oospore *Pythium* spp., with *P. oligandrum* strains predominating. Phylogenetic analyses based on the genes encoding the cytochrome oxidase I and one tubulin allowed these strains to be clustered into three groups. The sequencing of the elicitor-like genes, whose proteins are key components in inducing systemic resistance in plants, showed that each strain held at least one gene encoding for each of the two kinds of *P. oligandrum* elicitors (*i.e.* oligandrins and Cell Wall Proteins). Sequencing and molecular fingerprinting analyses showed thus that the type of soil and the rhizosphere microbiota did not shape the population structure of *P. oligandrum*. However, other factors such as the different kinds of rootstock and weeding management can also have an influence on the root colonization by *P. oligandrum*.

The relationship between *P. oligandrum* and grapevine was studied using a transcriptomic approach (*microarray Vitis vinifera*, 29 549 genes). The results highlighted the modifications induced by young vines in response to *P. oligandrum* root colonization, in the genetic expression of several genes belonging to different metabolic pathways. Two aspects, that are usually opposed, were observed: *P. oligandrum* was perceived by the plant either (i) as a pathogen because certain defence reactions were triggered (*e.g.* calcium signalling, resistance genes, abscisic acid metabolism) or as (ii) a symbiotic microorganism since several transcriptional changes were similar to those reported in symbiotic interactions (*e.g.* induction of subtilase genes).

An assay aimed at protecting grapevine against a pathogenic fungus involved in esca, and known to be responsible for wood necrosis, *i.e.* *Phaeoaniella chlamydospora*, was carried out. The root colonization by *P. oligandrum* was associated with a reduction in the length of necroses. In line with this result, transcriptomic analyses by microarrays and RT-qPCR showed overexpression of several genes, particularly those of the ethylene pathway. Some of these induced genes could be thus used as resistance markers, but this needs to be validated in further experiments.

Keywords : Biocontrol, elicitor-like proteins, esca, grapevine trunk diseases, induced resistance, *Pythium oligandrum*, *Phaeoaniella chlamydospora*, soil microflora

# Résumé

Les recherches sur la lutte biologique (ou biocontrôle) par utilisation de micro-organismes connaissent un essor remarquable, les applications au champ étant cependant encore limitées en raison des variations d'efficacité dans la protection des plantes. Celles-ci sont souvent imputées à la non persistance des agents de biocontrôle dans la rhizosphère ou sur le végétal qu'ils sont censés protéger. Afin de réduire ce risque, une solution consiste à utiliser des micro-organismes isolés du végétal que l'on souhaite protéger.

Dans le cadre de cette thèse, *Pythium oligandrum*, un oomycète colonisateur de la rhizosphère de nombreuses plantes dont la vigne, a été étudié pour lutter contre l'esca, une maladie du bois de la vigne pour laquelle il n'existe actuellement aucune méthode de lutte disponible.

Des souches de *P. oligandrum* ont été isolées de la rhizosphère de ceps cultivés dans 3 régions viticoles (12 vignobles) du Bordelais présentant des sols variés : argilo-calcaire, sable-graveleux et graveleux. Les analyses des communautés fongiques et bactériennes obtenues par empreinte moléculaire (Single Strand Conformation Polymorphism) ont montré que, contrairement aux bactéries, les espèces fongiques différaient selon les régions. Des *Pythium* spp. aux oospores échinulées ont été isolées à partir des racines des ceps échantillonnés, avec une prédominance de *P. oligandrum* (séquençage de la région ITS). L'analyse des séquences des gènes codant pour le cytochrome oxydase I et une tubuline a permis de constituer 3 groupes de souches. Le séquençage d'autres gènes codant pour des protéines « élicitines-like » a indiqué que chaque souche présentait au moins un gène codant pour chacun des 2 types d'éliciteurs de *P. oligandrum* : l'oligandrine et les protéines de la paroi cellulaire (CWPs). Il apparaît que le type de sol et la microflore associée à la rhizosphère n'exerceraient pas une influence suffisante pour que la structure génétique des populations de *P. oligandrum* soient associées à un contexte tellurique particulier. En revanche, le type de porte-greffe et la méthode de désherbage (chimique ou mécanique) pourraient avoir une incidence sur la colonisation racinaire par *P. oligandrum*.

Les relations entre *P. oligandrum* et les racines de la vigne ont été étudiées par analyse transcriptomique (microarray *Vitis vinifera* de 29 549 gènes). Les résultats obtenus montrent que de jeunes plants de vigne ont répondu à la colonisation racinaire par *P. oligandrum* en modifiant l'expression de gènes intervenant dans plusieurs voies métaboliques. Deux aspects *a priori* opposés ont été observés : *P. oligandrum* serait perçu comme (1) un agresseur contre lequel la plante a mis en place des réactions de défense mais en même temps, comme (2) un micro-organisme symbiotique car un certain nombre de modifications transcriptionnelles étaient similaires à celles reportées dans les interactions rhizosphériques symbiotiques (e.g. forte stimulation de gènes codant pour des subtilases).

Un essai visant à induire chez la vigne une protection contre un champignon pathogène impliqué dans l'esca, *Phaeoconiella chlamydospora*, grâce à *P. oligandrum*, a été réalisé. La colonisation des racines par *P. oligandrum* a été associée à une réduction de la longueur des nécroses dues à *P. chlamydospora*. En adéquation avec ce résultat, l'analyse transcriptomique par RT-PCRq et microarrays a montré une surexpression de la voie de l'éthylène. Plusieurs gènes spécifiquement induits constitueraient des marqueurs de résistance qu'il conviendra de valider lors de prochaines expérimentations.

Mots clés : biocontrôle, élicitines-like protéines, esca, maladies du bois, microflore tellurique, *Pythium oligandrum*, *Phaeoconiella chlamydospora*, résistance induite