THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Interactions plantes-microorganismes

Présentée et soutenue par :

M. ROMAIN PIERRON

le vendredi 3 avril 2015

Titre :

ESCA ET VIGNE: COMPREHENSION DES MECANISMES DE DEFENSE PRECOCES DU BOIS DE LA VIGNE VITIS VINIFERA L. SUITE A LA MALADIE, COLONISATION DES CHAMPIGNONS IN PLANTA ET PROPOSITION DE MOYENS DE LUTTE POUR UNE VITICULTURE DURABLE

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Ecole d'Ingénieur Purpan (EI PURPAN)

Directeur(s) de Thèse :

M. FRÉDÉRIC VIOLLEAU

M. ALBAN JACQUES

Rapporteurs :

M. AZIZ AZIZ, UNIVERSITE DE REIMS

M. PATRICE REY, ENITA BORDEAUX

M. PIERRE COUTOS-THEVENOT, UNIVERSITE DE POITIERS

Membre(s) du jury :

Mme FLORENCE MATHIEU, INP TOULOUSE, Président

M. ALBAN JACQUES, EI PURPAN, Membre

M. FRÉDÉRIC VIOLLEAU, EI PURPAN, Membre

M. JOSEP ARMENGOL, UNIVERSITAT POLITECNICA DE VALENCE, Membre

M. STEPHANE COMPANT, INP TOULOUSE, Membre

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes encadrants Alban Jacques et Stéphane Compant ainsi que mon directeur de thèse Frédéric Violleau. Vous m'avez formé à la recherche en sciences végétale, métier qui me passionne plus qu'aucun autre. Pour votre disponibilité et votre soutien, vous avez toute ma gratitude. Alban, Stéphane, si vous pouviez simplement arrêter de m'appeler « Gamin » dans les réunions européennes et les congrès à l'avenir…

Je remercie également les financeurs de ce projet, l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan et la région Midi-Pyrénées. Je suis reconnaissant à la pépinière viticole Daydé, et plus particulièrement envers Hubert Croc, qui a toujours été disponible et a fourni des sarments de très bonne qualité.

Je remercie les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail : Pr. Dr. Josep Armengol de l'université de Valence en Espagne, Pr. Dr. Patrice Rey de l'université de Bordeaux Sciences Agro, Pr. Dr. Pierre Coutos-Thévenot de l'université de Poitiers, Dr. Aziz Aziz de l'université de Reims et Pr. Dr. Florence Mathieu de l'INP-ENSAT, en temps qu'examinateurs.

Mes pensées vont vers Christel Couderc et Mireille Gaucher-Delmas, les personnes de l'ombre que je ne saurais assez remercier. Votre soutien technique a été essentiel, merci. Christel, tu as toujours été attentive et sais détecter mieux que personne les états d'âmes de thésards.

La thèse forme à la recherche par la recherche, mais également à l'enseignement, notamment lors de l'encadrement des stagiaires. Vous avez posé quelques briques à la structure de ce travail. Je tiens donc à remercier personnellement : Fouad, Jessica, Aleksandar, Pamela, Meng, Yanru et Ingrid.

Je ne peux omettre de remercier mes collègues thésardes : Marielle, Sophie, Claire, Hélène, Eugénie et Ana. Merci à Jonas, Simon et Mika. Vous apportiez un peu de virilité dans cet univers féminin.

Je dis un grand merci à tous les amis !

Enfin je remercie particulièrement ma famille et mes proches pour leur soutien durant toutes ces années.

Sommaire

Remerciements 3

Sommaire 5

Résumé 11

Abstract 12

Liste des abréviations 13

Liste des illustrations 15

Avant-propos 19

CHAPITRE I : Introduction générale 21

1 La vigne 22

1.1 Les contextes de la vigne et du vin 22

1.1.1 Contexte historique 22

1.1.2 Contexte économique 22

1.2 Taxonomie et reproduction de la vigne 23

1.2.1 Taxonomie 23

1.2.2 Croissance végétative 25

1.2.3 Reproduction 25

1.2.3.1 La floraison et la reproduction sexuée 25

1.2.3.2 La reproduction asexuée en pépinière 25

1.3 L'itinéraire technique en viticulture 27

2 Les principales maladies d'origine biotique de la vigne 29

2.1 Les maladies des organes herbacés de la vigne 30

2.1.1 L'Oïdium 30

2.1.2 Le mildiou 31
2.1.3 La pourriture grise 32
2.1.4 L'excoriose 33
2.1.5 La flavescence dorée 33
2.2 Les principales maladies du bois de la vigne 34
2.2.1 L'eutypiose 34
2.2.2 Le Black Dead Arm 36
2.2.3 L'esca 37
3 L'esca : description du pathosystème et moyens de lutte 38
3.1 Le(s) pathosystème(s) associé(s) à l'esca 38
3.1.1 Généralités 38
3.1.2 Publication N°1: In-depth knowledge of the black box of Esca disease in grapevine, a requirement for the complex pathosystem's understanding and for future prospects. Romain J. G. Pierron, Stéphane Compant, Jérôme Pouzoulet, Harald Berger, Walter D. Gubler, Markus Gorfer, Angela Sessitsch, Joseph Strauss and Alban Jacques. In preparation 39
3.2 Les moyens de Lutte contre l'esca 61
3.2.1 Les moyens de lutte chimique 61
3.2.2 La prophylaxie en pépinière 61
3.2.2.1 Le diagnostic microbiologique 62
3.2.2.2 Le diagnostic moléculaire 63
3.2.3 La prophylaxie au vignoble 64
3.2.4 Les solutions alternatives 65
3.2.4.1 Le contrôle biologique 65
3.2.4.2 L'emploi de molécules oxydantes en agriculture, moyen de lutte de demain ? 66
4 Anatomie et physiologie de la défense du bois de la vigne 67
4.1 Particularités anatomiques et physiologiques du bois des lianes 67
4.2 Le modèle CODIT : compartimentation de la pourriture dans le tronc 69
4.3 Les grands types de défenses chez les plantes 72
4.4 L'induction des défenses chez *Vitis vinifera* L. 74
4.4.1 La reconnaissance 74
4.4.1.1 Le modèle gène pour gène 74

4.4.1.2 Les éliciteurs de la défense végétale 75
4.4.2 La signalisation 77
4.4.2.1 La signature Ca^{2+} et son décodage 77
4.4.2.2 La participation des ROS à la signalisation 77
4.4.3 Les réponses 78
4.4.3.1 Les hormones de la défense 78
4.4.3.2 Les phytoalexines et les protéines « PR » 79
4.4.3.3 Les effecteurs et le modèle en Zigzag 81
4.4.3.4 La réponse du métabolisme primaire 83

5 Objectifs et stratégie 84

5.1 Synthèse du contexte 84

5.2 Objectifs 85

Chapitre II : Matériels et méthodes 87

1 Les conditions de cultures 88

1.1 Conditions de culture du matériel végétal 88

1.1.1 Origine des plants 88
1.1.2 Bouturage 88
1.1.3 Plants bouturés 88

1.2 Conditions de culture des champignons 89

1.2.1 Le maintien des souches 89
1.2.2 Suspensions de spores 89

2 Modes d'inoculation des plants avec le matériel fongique 89

2.1 L'inoculation en modèle plaie de taille 89

2.2 L'inoculation en modèle entre-nœud 90

2.3 Le modèle d'inoculation mixte 91

2.4 L'inoculation des plugs de gélose 91

2.5 Application de l'eau ozonée 91

3 Méthodes de Biologie moléculaire ____ *92*

3.1 ARN ____ **92**

3.1.1 Extraction d'ARN ____ 92

3.1.2 Digestion de l'ADN génomique et transcription inverse (RT) ____ 93

3.1.3 RT-qPCR ____ 94

3.2 ADN ____ **95**

3.2.1 Extraction d'ADN de *Vitis vinifera* L. ____ 95

3.2.2 Extraction d'ADN de champignon ____ 96

3.2.3 Quantification de copies d'ADN fongique qPCR plexor system ____ 96

3.2.4 Standards qPCR Plexor ____ 96

4 Méthodes de microscopie à fluorescence ____ *97*

4.1 Transformation de souches fongiques ____ **97**

4.2 Observation au microscope CSLM ____ **99**

4.2.1 Préparation des échantillons *gfp* ____ 99

4.2.2 Marquage des souches sauvages non-transformées ____ 99

4.2.3 Prises et traitements des images ____ 99

5 Analyses statistiques ____ *100*

Chapitre III : Compréhension des interactions précoces entre la vigne et les champignons associés à l'esca ____ *101*

1 Approche histologique des interactions précoces de l'esca ____ *102*

1.1 Les évènements précoces de la colonisation du bois de *Vitis vinifera* L. par *Phaeoacremonium aleophilum* ____ **102**

1.1.1 Généralités ____ 102

1.1.2 Publication N°2 : Deciphering the niches of colonisation of *Vitis vinifera* L. by the esca–associated fungus *Phaeoacremonium aleophilum* using a *gfp* marked strain and cutting systems. Romain J. G.

Pierron, Markus Gorfer, Harald Berger, Alban Jacques, Angela Sessitsch, Joseph Strauss and Stéphane Compant. Submitted to *PlosOne* 104

1.2 La colonisation du bois de *Vitis vinifera* L. par *Phaeomoniella chlamydospora* 130

1.2.1 Transformation de *Phaeomoniella chlamydospora* 130

1.2.2 Colonisation de *Phaeomoniella chlamydospora*::*gfp1* 12 semaines après inoculation 131

1.3 Les évènements précoces de la colonisation du bois de *Vitis vinifera* L. par *Phaeomoniella chlamydospora* co-inoculé avec *Phaeoacremonium aleophilum* 133

1.4 Discussion de l'approche histologique de la colonisation précoce de *P. aleophilum* et *P. chlamydospora*. 133

1.4.1 Colonisation précoce des tissus du bois 135

1.4.2 Réponse des tissus du bois inoculé 136

2 Approche moléculaire des interactions précoces entre le bois de la vigne et les champignons associés au « young esca » 138

2.1 Contrôle de la colonisation des modèles entre-nœud et plaie de taille 139

2.2 Cinétique courte de la réponse à la blessure chez *Vitis vinifera* L. 140

2.2.1 Les gènes étudiés et leurs fonctions 140

2.2.2 La réponse à la blessure du bois chez *Vitis vinifera* L. en l'absence de pathogènes 141

2.3 Perception des pathogènes associés à l'esca dans le bois de *Vitis vinifera* L. 142

2.3.1 Les gènes peu induits 143

2.3.2 Les gènes induits 144

2.3.3 Cinétique d'induction du gène réprimé *LOX9* 151

2.4 Discussion de l'approche moléculaire des interactions précoces vigne-microbes 151

3 Discussion sur les interactions précoces entre la vigne et les champignons associés à l'esca 156

Chapitre IV : Proposition de moyens de lutte contre l'esca 161

1 Proposition d'un modèle de criblage des agents de biocontrôle des maladies du bois de la vigne en laboratoire 162

1.1 Généralités _____ 162

1.2 Publication n°3: A model for biological control studies of Grapevine Trunk Diseases under laboratory conditions. Romain J. G. Pierron, Jérôme Pouzoulet, Adel Meziane, Nathalie Mailhac and Alban Jacques. Eds S. Compant and F. Mathieu _____ 163

2 Application des procédés d'ozonation pour contrôler l'esca _____ 176

2.1 Généralités _____ 176

2.2 Publication N°4 : *In vitro* and *in planta* fungicide properties of ozonated water against the esca-associated fungus *Phaeoacremonium aleophilum*. Romain J. G. Pierron, Marielle Pagès, Christel Couderc, Stéphane Compant, Alban Jacques and Frédéric Violleau. Submitted to *Scientia horticulturae* _____ 177

Chapitre V : Conclusion générale et perspectives _____ 197

1 La compréhension des événements précoces des interactions entre le bois de la vigne et les champignons associés à l'esca _____ 198

2 Le développement de moyens de lutte _____ 201

Références _____ 205

Curriculum vitae _____ 224

Résumé

L'esca est une maladie du bois de la vigne complexe et mal connue, contre laquelle aucun moyen de lutte efficace n'existe à ce jour.

Ce travail s'est concentré sur les interactions précoces entre *Vitis vinifera* L. et les champignons associés au « young esca » *P. chlamydospora* et *P. aleophilum* dans deux types de tissus lignifiés : l'entre-nœud et le nœud (modèle plaie de taille). La colonisation 6 et 12 semaines après traitement des souches transformées *P. aleophilum*::*gfp*7 et *P. chlamydospora*::*gfp*1 a été observée. Les deux espèces coloniseraient différents tissus dans les premières semaines suivant l'infection. Les fibres du xylème constitueraient un tissu essentiel lors de l'interaction précoce entre *P. aleophilum* et la vigne, tandis que *P. chlamydospora*::*gfp*1 a seulement colonisé les vaisseaux du xylème après 12 semaines. Le bois de la vigne présenterait des réponses spécifiques à la présence de *P. aleophilum* 6 semaines après traitement, puis générales à la blessure 12 semaines après traitement, en microscopie.

L'hypothèse de la spécificité de la réponse induite dans le bois de la vigne par ces deux espèces a été confirmée en étudiant l'expression de 11 gènes associés à la défense 10 h, 24 h, 48 h et 120 hpi. La réponse précoce du bois de la vigne varirait suivant l'identité des agents pathogènes présents dans la blessure. Les tissus de l'entre-nœud ont été induits différemment par la blessure par rapport aux tissus dans la région nodale.

Un modèle pour le criblage d'agents de biocontrôle ou d'éliciteurs contre l'esca en quelques mois en conditions de laboratoire a permis le développement d'un moyen de lutte durable et novateur, l'eau ozonée. L'eau ozonée présente des propriétés sporicides remarquables contre *P. aleophilum in vitro*. *In planta* l'application d'eau ozonée sur une blessure infectée en modèle plaie de taille a réduit de moitié la quantité de mycélium capable de se développer dans le bois 9 semaines après inoculation.

Mots clefs : Maladies du bois ; Esca ; *Vitis* ; *Phaeoacremonium* ; *Phaeomoniella chlamydospora*, colonisation, *gfp*, RT-qPCR, lutte intégrée, eau ozonée

Abstract

Esca is a complex pathosystem, poorly understood, affecting the grapevine's trunk. Currently there is not efficient tools to control esca disease.

This study investigated early events between grapevine and fungi associated to young esca, *P. aleophilum* and *P. chlamydospora*, in two different woody tissues: at the internode and at the nodal (pruning wound model) levels. The colonization of transformed strains *P. aleophilum*::*gfp7* and *P. chlamydospora*::*gfp1* was observed 6 and 12 weeks post inoculation. Fungal species colonized different tissues during the first weeks of infection. Xylem fibres could be the key site of *P. aleophilum*-grapevine early interactions, whereas *P. chlamydospora*::*gfp1* only colonized xylem vessels 12 weeks post inoculation. Grapevine wood may respond specifically to *P. aleophilum* after 6 weeks. This response seemed to be related to healing in microscopy, and thus aspecific 12 weeks post inoculation.

The specificity of induced response in the wood of *Vitis vinifera* L. was confirmed by studying gene expressions of 11 defense-related genes 10 h, 24 h, 48 h and 120 hpi. The early response of woody tissues could be specific to pathogen identity in grapevine. Wounding damages induced defense-related genes differently according the tissues (internode vs node).

A model for screening biological control agents or elicitors in laboratory conditions, within months, has been used to develop a sustainable and original control tool: ozonated water. Ozonated water presented remarkable sporicidal properties on *P. aleophilum in vitro*. Infected pruning wound treated with ozonated water reduced the *P. aleophilum* inoculum able to develop in the injured wood by a two-fold 9 weeks post inoculation.

Key words: Trunk diseases; Esca; *Vitis*; *Phaeoacremonium*; *Phaeomoniella chlamydospora*; colonization; *gfp*; RT-qPCR; Integrated Pest Management; ozonated water

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNr	ADN ribosomique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ARNr	ARN ribosomique
AS	Acetosyringone
AVR	gène d'avirulence
avr	gène de virulence
BCA	Agent de contôle biologique
BDA	Black Dead Arm
CAM	Calmoduline
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CIA	Choroforme Alcool Isoamylique
CODIT	Compartmentalization Of Decay In Trees
CTAB	Hexadecyltrimethylammonium Bromide
cv	Cultivar
CWinv	Cell Wall invertase
DAMPs	Damage Associated Molecular Patterns
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétraacétique
EF1-α	Facteur d'élongation 1 alpha
Et	Ethylène
ETI	Effector Triggered Immunity
Fib.Xyl	Fibre du xylème
FISH	Fluorescent *In Situ* Hybridization
GFP	Green Fluorescent Protein
GLSD	Grapevine Leaf Stripe Disease
GSTs	Glutathione S transferases
hpi	heure post inoculation
ISR	Induced Systemic Resistance
ITS	Espaceur Interne Transcrit
JA	Acide Jasmonique
LB	Bouillon Lysogène
LOX	Lipoxygenase
LRR	Leucin Rich Repeat
LZ	Leucin Zipper
MAP	Mitogen-activated protein
MEA	Extrait de Malt Agar
MES	Acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonique
NBS	Nucleotide Binding Site
nd	non déterminé
OA	Oat Agar
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase
Pal	*Phaeoacremonium aleophilum*
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Pattern
Par	Parenchyme
PBS	Tampon Phosphate Salin
Pch	*Phaeomoniella chlamydospora*
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PGPB	Plant Growth Promoting Bacteria
PR	Pathogenesis Related protein
PRRs	Pattern Recognition Receptor
PTI	PAMP Triggered Immunity
PVPP	Poly vinyl(poly)pyrolindone
qPCR	quantitative PCR
RLKs	Receptor-Like Kinases
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Reverse transcription
RT-qPCR	Reverse Transcriptase qPCR
SA	Acide Salicylique
SAR	Systemic Acquired Resistance
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Ser/Thr	Serionie/Threonine (kinase)
SOD	Superoxyde dismutase
SSTE	SDS Salt TRIS EDTA
STS	Stilbène synthase
TIR	Toll Interleukin Receptor
TL	Thaumatine-like
TLb	Thaumatine-like b
Tris	trishydroxyméthylaminométhane
V.Xyl	Vaisseau du xylème
WGA	Wheat Germ Agglutinin
ZR	Zone de réaction

Liste des illustrations

Figure 1 Arbre taxonomique des Vitacées d'après Reynier (2011) 23
Figure 2 Classification du matériel de multiplication des cépages certifiés (source FranceAgriMer) 26
Figure 3 Les opérations techniques au vignoble (d'après Reynier 2011) 27
Figure 4 Corrélation entre l'emploi de produits phytosanitaires et les bassins de productions agricoles (Butault et al. 2011) 28
Figure 5 Feuilles (a) et baies (b) atteintes d'oïdium. 30
Figure 6 Face supérieure (a), face inférieure (b) des feuilles et baies (c) touchées par le mildiou de la vigne. 31
Figure 7 Baies (a) et sarment (b) atteints de pourriture grise. 32
Figure 8 Sarment atteint d'excoriose. 33
Figure 9 Feuilles souffrant de la flavescence dorée (h) dont le vecteur est la cicadelle *Scaphoideus titanus* (j). 34
Figure 10 Les symptômes au niveau du bois et des feuilles de *Vitis vinifera* atteintes d eutypiose (a-c), d'esca (d-f) et de Black Dead Arm également appelé chancre à *Botryosphaeria* (g-k). 35
Figure 11 Procédés de fabrication des plants de vigne greffés-soudés en pépinière viticole. 62
Figure 12 Pline l'ancien décrit les risques liés à une mauvaise taille ou un labour trop près du cep dans le cadre du contrôle des maladies de la vigne d'après Bostock et al.(1855) 65
Figure 13 Description de la cicatrisation suite à une blessure au niveau du tronc chez les arbres. 69
Figure 14 Le modèle CODIT théorisant la mise en place de 4 types de barrières suite à la blessure 70
Figure 15 Les réactions de la plantes en réponse au panel de pathogènes potentiels. 72
Figure 16 La spécificité immunitaire chez les plantes. 75
Figure 17 Les trois grandes hormones de la défense végétale. 78
Figure 18 La base 1,2-Diphenyléthylène des stilbènes. 80
Figure 19 Le modèle en Zigzag.. 82
Figure 20 Schéma général de la réponse de la vigne aux stress biotiques.. 83

Figure 21 Schéma du modèle d'inoculation mixte. 90
Figure 22 Vecteur pCBCT utilisé pour la transformation des souches *P. aleophilum* et *P. chlamydospora*. 98
Figure 23 Photographies de *P. chlamydospora*::*gfp* à partir de cultures sur milieu PDA..... 130
Figure 24 Colonisation du bois de la vigne par *P. chlamydospora*::*gfp1* 12 semaines après inoculation. 132
Figure 25 Colonisation du bois de la vigne par *P. chlamydospora*::*gfp1* co-inoculé avec *P. aleophilum* (non marqué) 12 semaines après inoculation. 134
Figure 26 Quantification de l'ADN fongique de *P. aleophilum* et *P. chlamydospora*. 139
Figure 27 Réponse moléculaire du bois de la vigne à la blessure. 142
Figure 28 Cinétique de l'induction du gène *CWinv* en modèle entre-nœud et plaie de taille, 10h, 24h, 48h et 120h après blessure (mock) ou inoculation de *P. aleophilum* (Pal), *P. chlamydospora* (Pch) et des deux espèces co-inoculées (Pch et Pal). 143
Figure 29 Cinétique de l'induction du gène *PIN* en modèle entre-nœud et plaie de taille, 10h, 24h, 48h et 120h après blessure (mock) ou inoculation de *P. aleophilum* (Pal), *P. chlamydospora* (Pch) et des deux espèces co-inoculées (Pch et Pal). 144
Figure 30 Cinétique de l'induction du gène *CAM* en modèle entre-nœud et plaie de taille, 10h, 24h, 48h et 120h après blessure (mock) ou inoculation de *P. aleophilum* (Pal), *P. chlamydospora* (Pch) et des deux espèces co-inoculées (Pch et Pal). 145
Figure 31 Cinétique de l'induction du gène *TL* en modèle entre-nœud et plaie de taille, 10h, 24h, 48h et 120h après blessure (mock) ou inoculation de *P. aleophilum* (Pal), *P. chlamydospora* (Pch) et des deux espèces co-inoculées (Pch et Pal). 146
Figure 32 Cinétique de l'induction du gène *PAL* en modèle entre-nœud et plaie de taille, 10h, 24h, 48h et 120h après blessure (mock) ou inoculation de *P. aleophilum* (Pal), *P. chlamydospora* (Pch) et des deux espèces co-inoculées (Pch et Pal). 147
Figure 33 Cinétique de l'induction du gène *PR10.3* en modèle entre-nœud et plaie de taille, 10h, 24h, 48h et 120h après blessure (mock) ou inoculation de *P. aleophilum* (Pal), *P. chlamydospora* (Pch) et des deux espèces co-inoculées (Pch et Pal). 148
Figure 34 Cinétique de l'induction des gènes *STS* et *STS8* en modèle entre-nœud et plaie de taille, 10h, 24h, 48h et 120h après blessure (mock) ou inoculation de *P. aleophilum* (Pal), *P. chlamydospora* (Pch) et des deux espèces co-inoculées (Pch et Pal). 149

Figure 35 Cinétique de l'induction du gène *TLb* en modèle entre-nœud et plaie de taille, 10h, 24h, 48h et 120h après blessure (mock) ou inoculation de *P. aleophilum* (Pal), *P. chlamydospora* (Pch) et des deux espèces co-inoculées (Pch et Pal). 150
Figure 36 Cinétique de l'induction du gène *Vv17.3* en modèle entre-nœud et plaie de taille, 10h, 24h, 48h et 120h après blessure (mock) ou inoculation de *P. aleophilum* (Pal), *P. chlamydospora* (Pch) et des deux espèces co-inoculées (Pch et Pal). 150
Figure 37 Cinétique de l'induction relative du gène *LOX9* en modèle entre-nœud et plaie de taille, 10h, 24h, 48h et 120h après blessure (mock) ou inoculation de *P. aleophilum* (Pal), *P. chlamydospora* (Pch) et des deux espèces co-inoculées (Pch et Pal). 151
Figure 38 Synthése de l'induction relative des gènes de défense du bois de la vigne en réponse à la blessure, *P. aleophilum*, *P. chlamydospora* et la co-inoculation des deux espèces 10h, 24h ; 48h et 120h après traitement en modèle entre-nœud et plaie de taille. 152

Tableau 1 L'emploi des pesticides en viticulture par rapport aux autres productions. (Butault et al. 2011)..... 29
Tableau 2 Séquences des gènes d'intérêts utilisées lors des études d'expression de gènes.. 95
Tableau 3 La fonction des gènes étudiés. 140

Avant-propos

Les maladies du bois, et en particulier l'esca, sont une menace grandissante pour le vignoble mondial. L'esca est/ (sont) une/ (des) maladie(s) complexe(s). L'expression des symptômes foliaires serait le fruit de l'interaction d'un désordre des communautés microbiennes colonisant le tronc avec des facteurs environnementaux qui catalyseraient l'impact de toxines et/ou de désordres vasculaires sur les rameaux. Le pathosystème de l'esca peut être approché suivant deux visions. L'une est une vision systémique de l'esca. Dans ce cas l'esca désigne au sens large toutes les formes de maladies du bois entraînant la palette de symptômes foliaires allant du BDA à l'esca et pouvant aboutir à l'apoplexie. Il s'agit d'une approche agronomique. Celle-ci est renforcée par les études des communautés microbiennes colonisant les plantes saines ou symptomatiques. Tous les pathogènes du bois sont isolés dans les ceps présentant des symptômes foliaires ou apoplectiques avec une certaine constance : *Phaeoacremonium* spp., *Phaeomoniella chlamydospora*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea*, et les *Botryosphaeria* spp. L'approche systémique étudie les facteurs environnementaux associés à l'expression des symptômes. L'esca étant clairement un symptôme de flétrissement, l'approche systémique inclue l'étude de transport de l'eau dans les ceps atteints, ainsi que l'attribution des photoassimilats.

L'autre vision est réductionniste. Les différentes variations de l'expression des symptômes d'esca sont séparées en différentes maladies ou stades de la maladie (young esca, esca proper, BDA, GLSD, apoplexie). Certains pathogènes du bois sont associés à ces différentes formes. L'approche réductionniste facilite la compréhension du rôle de chaque pathogène dans le développement de l'esca. Elle permet également de mieux comprendre les réponses de la plante face à ces différents agents. Les travaux réalisés durant cette thèse appartiennent clairement à l'approche réductionniste de ce pathosystème.

L'approche réductionniste permet également de s'affranchir des problèmes du lien difficile entre pathogènes, symptômes dans le bois et expression des symptômes foliaires d'esca. En

effet lorsque les champignons pionniers associés aux maladies du bois sont inoculés dans le tronc, ils causent des nécroses. Les postulats de Koch sont donc validés dans le bois et à ce titre nous pouvons bien employer le terme de pathogènes pour ces organismes. Différents travaux portent sur le lien entre colonisation du bois par les pathogènes, sécrétion et transport de toxines et expression des symptômes foliaires. Ces études se concentrent donc sur des stades avancés du pathosystème esca.

Prévenir l'apparition des symptômes fait partie de la stratégie de lutte contre la maladie. L'autre angle d'attaque complémentaire serait de limiter ou d'empêcher la colonisation du bois par les champignons associés à l'esca. Cet aspect reste peu documenté car la compréhension des interactions entre la vigne et ces champignons est peu connue par rapport à d'autres modèles. Quel est le comportement des pathogènes envahissant le tronc dans les semaines suivant l'infection ? Existe-t-il une défense induite dans le bois de la vigne en réponse à la pénétration des pathogènes via une blessure ? Si le bois se défend, perçoit-il la présence des pathogènes de manière spécifique dans les quelques heures suivant l'inoculation, comme chez la feuille pour d'autres agents pathogènes connus ?

Afin d'apporter un début de réponse, ce travail a été orienté sur les étapes précoces de l'interaction entre le cépage Cabernet Sauvignon et deux organismes faisant partie des champignons pionniers de l'esca : *P. aleophilum* et *P. chlamydospora*.

Enfin la gravité du problème que représente l'esca s'abat sur les viticulteurs. A ce jour, il n'y a aucun moyen de lutte efficace contre l'esca. Le retrait de l'arsénite de soude en 2001 en France, compte tenu de sa toxicité, a été synonyme d'impasse technique pour les exploitants agricoles. Le modèle d'étude développé pour la compréhension fondamentale de ce pathosystème a été adapté pour le criblage de moyens de lutte contre l'esca au laboratoire. Un moyen potentiel de lutte innovant et durable, l'eau ozonée, sera présenté.

Dans un premier temps le contexte associé à l'esca sera défini. La vigne, sa physiologie et sa culture seront présentées, avant de développer la description des principales maladies touchant cette plante ligneuse. Le pathosystème associé à l'esca, ainsi que les moyens de lutte testés, seront plus précisément décrits. Ensuite, la mise en place des défenses végétales sera traitée afin de conclure ce chapitre introductif par les objectifs stratégiques de ces travaux de thèse.

CHAPITRE I : Introduction générale

1 LA VIGNE

1.1 LES CONTEXTES DE LA VIGNE ET DU VIN

1.1.1 Contexte historique

Divers fossiles de *Vitaceae* ont été datés du tertiaire et de l'holocène (Punt et al. 2003). La culture de la vigne accompagne ensuite l'homme dès le deuxième millénaire avant Jésus-Christ comme en témoigne les résidus de vin présents dans des jarres datant du néolithique (McGovern et al. 1996). Parmi le genre *Vitis* qui est majoritairement réparti dans l'hémisphère nord, seule l'espèce *Vitis vinifera* L. est indigène à l'Eurasie (This et al. 2006). La Mésopotamie serait le berceau de la domestication de cette espèce dont la culture sera diffusée sur quasiment tous les continents. Elle apparait dans de nombreuses sections de l'étude naturaliste de Pline l'Ancien (Bostock et al. 1855). L'expansion de la géolocalisation de la vigne a suivi celle de la colonisation grecque, de l'Empire Romain, et des égyptiens. Les missionnaires chrétiens étendront ensuite la diffusion de *Vitis vinifera* L. aux Amériques, mais également en Australie, en Nouvelle-Zélande ainsi qu'en Afrique du nord (This et al. 2006), tandis que le vignoble Sud-Africain sera dû à une colonie protestante contrainte à l'exil suite à la révocation de l'édit de Nantes en 1685 (Estreicher 2014).

Bien que l'histoire de la diffusion de la vigne soit intéressante, il est également important de noter que les mouvements importants de matériel végétal ont également causé la diffusion des pathogènes sur tous les continents. L'épidémie la plus importante connue est celle du phylloxera dû à l'introduction depuis les Etats-Unis du puceron *Daktulosphaira vitifoliae* Fitch dans les années 1860. Cette maladie n'appartient pas au passé puisque la résistance de certains porte-greffes hybrides a été contournée dans les années 1980 outre atlantique (Nabity et al. 2013). Suite à la diffusion de la vigne, il également intéressant de noter que désormais l'empreinte de l'activité humaine et l'importation des pathogènes originaire d'Amérique du Nord menace la vigne sauvage en Europe (Arnold et al. 2005).

1.1.2 Contexte économique

La surface du vignoble mondial couvrait 7 528 mha en 2012. Celle-ci a baissé de 400 mha depuis 2003. En réalité le vignoble européen a fortement diminué tandis que de nouveaux pays producteurs ont planté des surfaces importantes. Ainsi, entre 2000 et 2012, la surface

du vignoble européen a été réduite de 464 mha tandis que le vignoble chinois s'est agrandi de 90% soit 270 mha. Durant cette période le vignoble français a fondu de 12% (International Organisation of Vine and Wine 2013). Aujourd'hui, celui-ci s'étend sur 760 mha soit 3% des terres arables (http://www.franceagrimer.fr/). Selon Colbert, la vigne était « la plus importante des mines du royaume » (Dion 1977). Le secteur viticole a toujours eu et présente une importance économique considérable en France puisqu'il représente plus de 15% de la valeur de la production agricole (2ème rang derrière les céréales) et demeure le premier excédent de la balance commerciale française (http://www.franceagrimer.fr/). Enfin la filière viticole française est à l'origine de 250 000 emplois (http://www.franceagrimer.fr/). La forte valeur ajoutée des produits issus de la vinification justifie l'emploi de techniques et de traitements onéreux, mais nécessaires, afin de se rapprocher de l'optimum de production (Dion 1977).

1.2 TAXONOMIE ET REPRODUCTION DE LA VIGNE

1.2.1 Taxonomie

La famille des Vitacées comporte différent genres tels qu'*Ampelopsis*, *Cissus*, *Parthenocissus* ou *Vitis* (Figure 1).

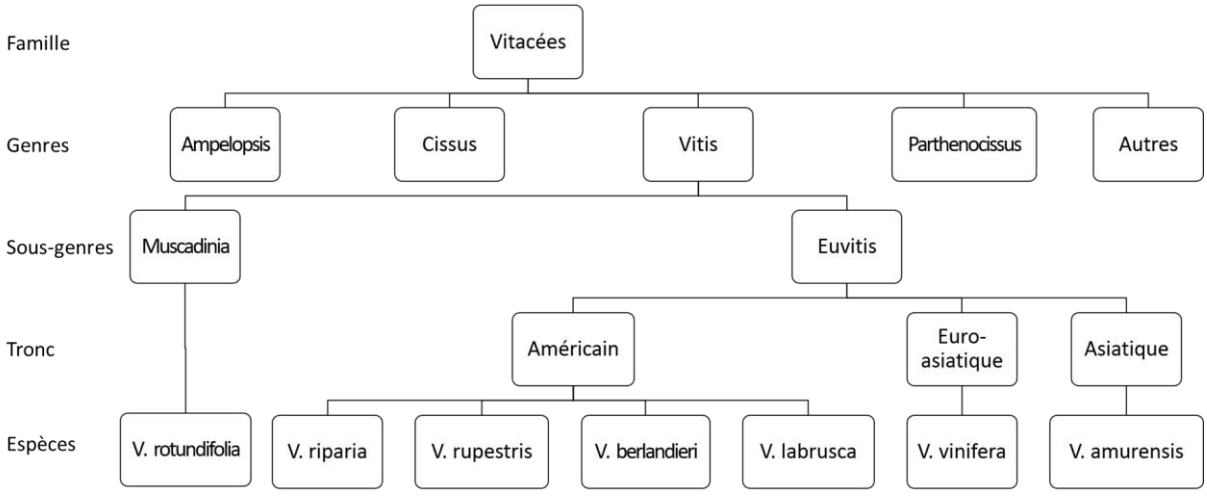


Figure 1 Arbre taxonomique des Vitacées d'après Reynier (2011).

Le genre *Vitis* se subdivise en deux sous genres : *Euvitis* (2n = 38) et *Muscadinia* (2n = 40) dont toutes les espèces sont des plantes à tiges sarmenteuses munies de vrilles ou d'inflorescences opposées aux feuilles (Reynier 2011). Les espèces présentées sont toutes des plantes pérennes.

Le genre *Euvitis* est représenté par une seule espèce en Eurasie, *V. vinifera* L.. *V. amurensis* est présente en Asie. L'espèce *V. vinifera* se décline sous différents cépages (cultivars ou variétés) ayant différentes vocations viticoles. L'ampélographie, dont l'étymologie signifie « description des vignes », liste les critères de reconnaissances des différentes variétés (Reynier 2011). Il y aurait environ 10 000 cépages conservés dans le monde, cependant la caractérisation moléculaires réduirait ce nombre à 5000 variétés (This et al. 2006). Le génome de la vigne est relativement petit (environ 500 Mb), et comporte environs 30 000 gènes codant des protéines. Le peuplier, dont le génome à une taille proche, en contient 45 000 (Jaillon et al. 2007). En France, 117 conservatoires régionaux maintiennent 18 000 clones concernant 105 variétés (http://www.vignevin.com). Chaque terroir possède des cépages particuliers. Par exemple l'encépagement pour les vins rouges du vignoble bordelais comporte le Merlot, le Cabernet Franc, le Cabernet Sauvignon, le Côt et le Petit Verdot. D'autres cépages sont dédiés à la production de vins blancs. Le nombre de variétés à l'échelle nationale est déjà très important. Ces cépages présentent des tolérances différentes aux maladies (Murolo and Romanazzi 2014). Le Cabernet Sauvignon est un cépage noir du vignoble bordelais sensible à l'oïdium et peu sensible à la pourriture grise (Reynier 2011). Le Cabernet Sauvignon est considéré comme susceptible aux maladies du bois tandis que le Merlot semblerait plus tolérant (Grosman and Doublet 2012).

Le sous-genre *Euvitis* comprend les espèces d'Amérique du Nord présentant peu de qualités uvifères (*V. riparia*, *V. rupestris*, *V. berlandieri*, *V. labrusca*), mais ces espèces sont résistantes au phylloxéra (Reynier 2011). Cette résistance explique pourquoi ces espèces sont utilisées pour obtenir des porte-greffes et des hybrides producteurs directs (Reynier 2011).

V. rotundifolia est la seule espèce d'intérêt agronomique du sous-genre *Muscadinia* car elle est résistante à l'oïdium et au mildiou de la vigne (Feechan et al. 2013).

1.2.2 Croissance végétative

La réduction conjuguée de la photopériode et de la température induit l'entrée en dormance des bourgeons. Ces conditions de dormances sont essentielles au bourgeonnement l'année suivante, également appelé débourrement (Reynier 2011). La vigne est une liane ligneuse dont la croissance est active du printemps à l'automne avec un repos végétatif durant l'hiver. Le méristème apical exerce une forte dominance sur le développement des prompts-bourgeons et inhibe le développement des bourgeons latents. Le débourrement est donc acrotonique. Le sarment reste vert jusqu'à l'aoûtement qui correspond à la lignification des rameaux au moment où les raisins murissent (Reynier 2011).

1.2.3 Reproduction

1.2.3.1 La floraison et la reproduction sexuée

La vigne cultivée possède des fleurs hermaphrodites tandis que les vignes sauvages sont dioïques. En France, la floraison a généralement lieu en juin et s'étale sur deux semaines. La majorité des cépages peuvent être autogames cependant la fécondation allogame est plus efficace. La coulure fait suite à la fécondation : certaines fleurs non fécondées et des ovaires fécondés chutent ou « coulent ». Les ovaires restant « nouent » et se développeront en baies, pour cela ce stade porte de le nom de nouaison (Reynier 2011). La reproduction sexuée est essentielle à la production des raisins et donc du vin. Toutefois elle n'est pas importante concernant la reproduction du matériel végétal, contrairement à la reproduction par voie végétative.

1.2.3.2 La reproduction asexuée en pépinière

V. vinifera L. présente une forte sensibilité au phylloxéra et aux maladies cryptogamiques en comparaison aux vignes d'Amérique du Nord (Toffolatti et al. 2012). Le type de reproduction le plus utilisé est le bouturage. Le greffage consiste à fixer une bouture de sarment de *V. vinifera* sur une autre espèce, résistante au phylloxéra (Reynier 2011).

La production des plants de vigne fait l'objet d'une réglementation particulière (Figure 2), recommandée par l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP/EPPO 2008).

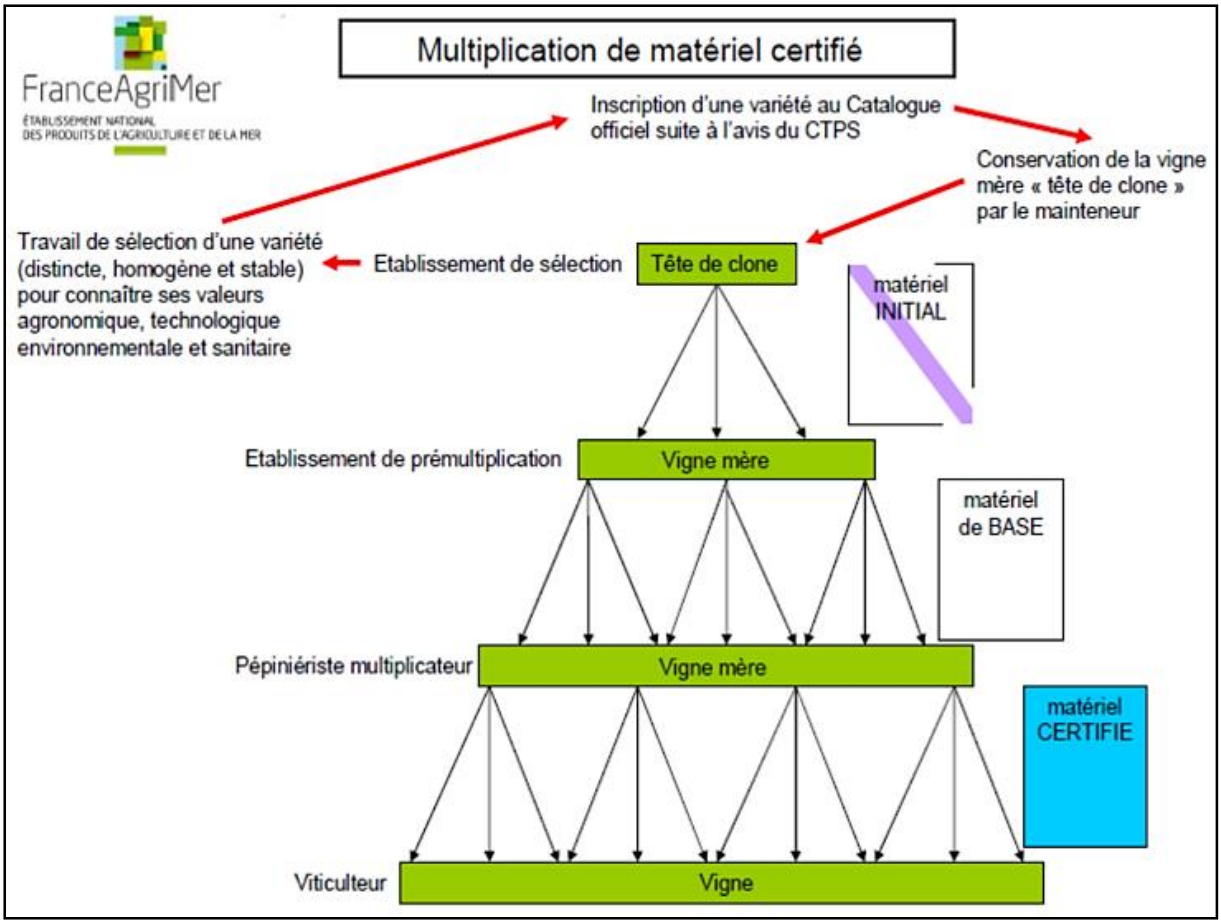


Figure 2 Classification du matériel de multiplication des cépages certifiés (source FranceAgriMer).

Le matériel initial (tête de clone) correspond à la sélection de variétés suivant leurs intérêts agronomiques et sanitaires. En France, seulement 14 structures possèdent l'agrément ministériel permettant de pré-multiplier ces variétés à partir de parcelles de vignes mères (matériel de base) issues de tête de clones. Ce matériel de base est utilisé par les pépinières multiplicatrices afin de confectionner les plants greffés soudés (matériel certifié), plantés par les viticulteurs au vignoble. Des contrôles sur les différents types de matériels sont effectués afin de garantir que les plants certifiés sont exempts de virus affectant la vigne. (http://www.franceagrimer.fr/).

Seules quelques pépinières en France approvisionnent l'ensemble du vignoble non seulement au niveau national mais également au niveau international. Ainsi, les pépiniéristes ont une position stratégique cruciale dans le contrôle des maladies, puisqu'ils centralisent la production de vastes régions viticoles. Longtemps décriés comme responsables de l'expansion de maladies comme celle du bois durant les années 2000 (Surico 2001), la responsabilité des pépinières semble moins certaine ou moins exclusive d'après les dernières études

scientifiques menées sur l'origine de la contamination et la flore colonisant les ceps de vigne (Gramaje and Armengol 2011; Bruez et al. 2014).

1.3 L'ITINERAIRE TECHNIQUE EN VITICULTURE

Les opérations au vignoble s'étalent sur toute l'année (Figure 3). Les activités principales de l'hiver sont la taille et le traitement du bois.

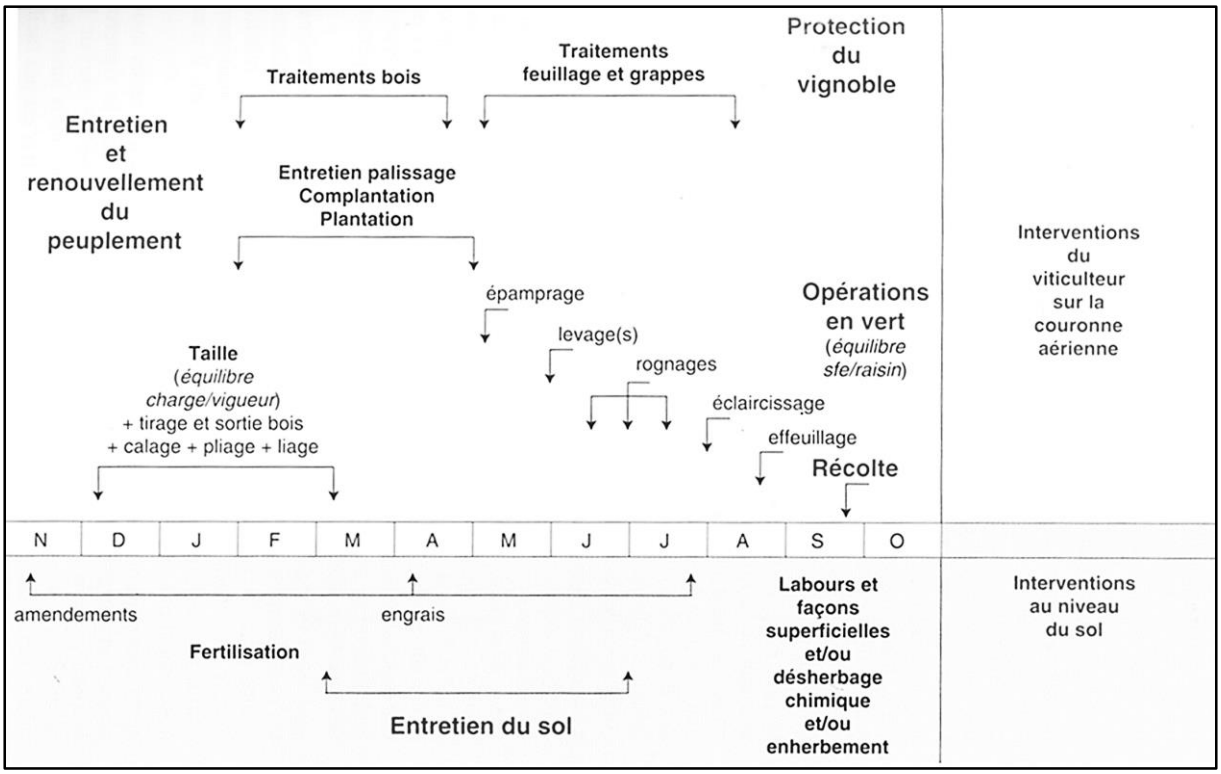


Figure 3 Les opérations techniques au vignoble (d'après Reynier 2011).

Du mois de Mai jusqu'au mois d'Août, différentes étapes de taille en vert visent à contenir la vigueur importante la vigne (épamprage, rognage, éclaircissage et effeuillage). C'est également une période où de nombreux traitements phytosanitaires sont appliqués sur les feuilles et les grappes afin d'assurer la vendange en Septembre.

Le calendrier des opérations techniques au vignoble met en évidence deux aspects importants dans l'orientation de cette thèse. La première est le nombre d'opérations de tailles infligées à la vigne tout au long de l'année de production. Il s'agit de la taille hivernale, lorsque le bois est dormant, ou bien de tailles en vert afin que les sarments n'obstruent par le rang, ou encore d'effeuillages afin que les baies de raisin reçoivent plus d'ensoleillement. Enfin les machines à

vendanger blessent les plantes au moment de la récolte. Les blessures sont donc fréquentes et créent des portes d'entrées pour les pathogènes. Or les pathogènes profitent de ces portes d'entrées afin de coloniser leur hôte (Agrios 2005).

Enfin le deuxième aspect est le nombre important de traitements en viticulture. Les zones d'utilisation importante de pesticides se superposent aux zones délimitant les bassins viticoles français (Figure 4). Ainsi la viticulture est l'une des productions utilisant le plus d'intrants, notamment les fongicides (Butault et al. 2011).

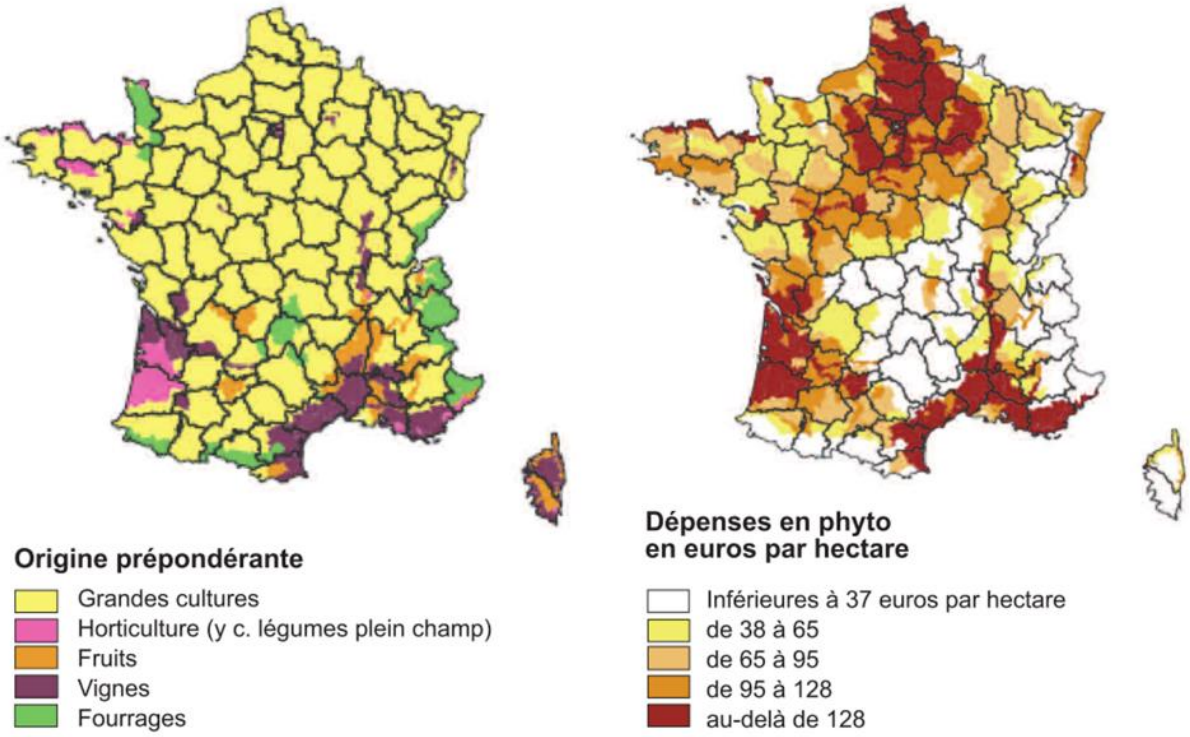


Figure 4 Corrélation entre l'emploi de produits phytosanitaires et les bassins de productions agricoles (Butault et al. 2011).

L'indice de fréquence de traitement (IFT) est un bon indicateur de l'utilisation des produits phytosanitaires (Giuliano 2014). Il correspond à la moyenne par hectare de l'utilisation des produits homologués, pondérée par le rapport entre la dose appliquée et la dose recommandée. En France, l'indice moyen de fréquence de traitement en viticulture est de 13. A titre de comparaison, la production de pomme a un IFT de 37 tandis que les grandes cultures ont un IFT moyen de 4 (Tableau 1). La production française de raisin nécessite donc d'appliquer 15% des pesticides employés en agriculture sur 3% de la SAU (Butault et al. 2011).

Un état de l'art récent indique que 30 000 tonnes de fongicides et bactéricides sont appliqués annuellement sur le vignoble français (http://www.endure-network.eu/ dans Compant et al. 2013). A l'échelle européenne, l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin estime que 70 000 tonnes de fongicides sont employées sur les 3,8 millions d'hectares dédiés à la viticulture (http://www.endure-network.eu/).

Tableau 1 L'emploi des pesticides en viticulture par rapport aux autres productions. (Butault et al. 2011)

	SAU		Pesticides	
	Milliers ha	%	Euros /ha	%
Grandes cultures	11 609	45,7	134	67,4
Vigne	841	3,3	394	14,4
Fruits	202	0,8	590	5,2
Horticulture et autres	205	0,8	527	4,7
Fourrages cultivés	1 533	6,0	66	4,4
Prairies	9 908	39,0	9	3,9
Jachère	1 122	4,4		0,0
SAU hors parcours	25 420	100	90,7	100

Calculs de l'Inra, source des données : Agreste - MAAPRAT - SSP

La viticulture française apparaît donc comme un utilisateur majeur de pesticides alors que les conséquences de leurs utilisations intensives sont de plus en plus décrites et décriées et incluent i) une persistance dans le sol, ii) une contamination de l'agroécosystème, iii) l'apparition de souches résistantes de phytopathogènes et iv) un problème pour la santé humaine (Aubertot et al. 2005). Les attentes sociétales de réduction des intrants en agriculture incitent les exploitants à modifier leur pratiques, mais également les organismes de recherche à développer des alternatives techniques aux molécules retirées du marché ou amenées à l'être (Compant et al. 2013). Les maladies nécessitant l'emploi de produits phytosanitaires sont nombreuses et touchent différents organes de la vigne.

2 LES PRINCIPALES MALADIES D'ORIGINE BIOTIQUE DE LA VIGNE

Parmi les différentes pathologies affectant la vigne, nous distinguerons les maladies des parties herbacées et les maladies du bois. Seules les maladies ayant un impact économique sur la production française sont abordées dans cette section.

2.1 LES MALADIES DES ORGANES HERBACES DE LA VIGNE

2.1.1 L'Oïdium

L'oïdium est la première maladie fongique affectant la vigne à avoir été introduite depuis l'Amérique du Nord sur le continent européen (Dubos 2002). Bien que touchant toutes les parties herbacées de la plante (Figure 5 a-b), l'oïdium se caractérise par l'aspect poussiéreux gris-blanchâtre de la surface des feuilles infectées (Figure 5 a). Le champignon ascomycète responsable est *Erysiphe necator* Schw. L'inoculum primaire provient de mycélium latent dans les bourgeons dormant (Rumbolz and Gubler 2005) ou bien de cléistothèces hivernant dans les anfractuosités du tronc.

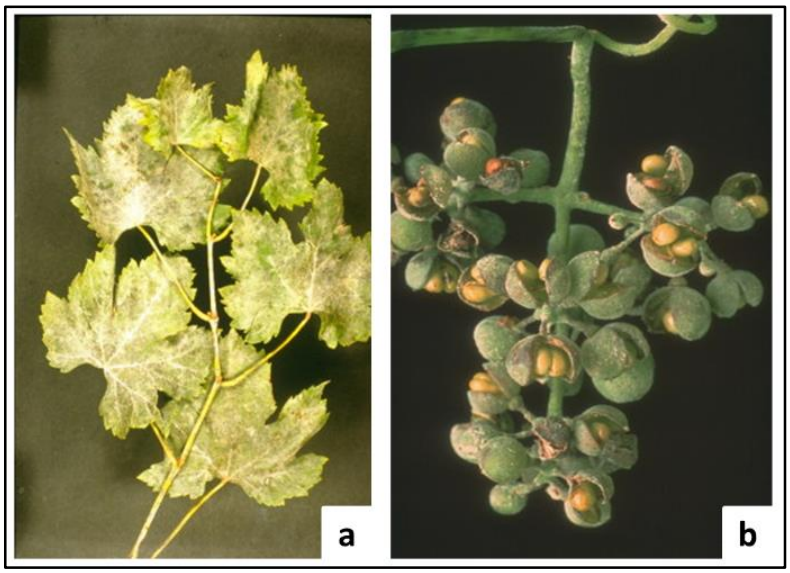


Figure 5 Feuilles (a) et baies (b) atteintes d'oïdium. Source (http://www7.inra.fr/hyp3).

L'oïdium est une maladie polycyclique, plusieurs cycles d'infections ayant lieu durant la même année de production. Des moyens de lutte existent dont la prophylaxie, des fongicides de contact ainsi que des inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (Strobilurines, Carboxianilides, Azoles, Quinoazolines, Chinolines et Benzophénones) (Gadoury et al. 2012; Dubos 2002; Kast and Bleyer 2011). La réduction du nombre de traitements de 7 passages préventifs à 3 lors de périodes à risque n'entraîne pas de différence d'efficacité de la lutte chimique (Kast and Bleyer 2011). Plusieurs traitements alternatifs ont été testés : composte immature de thé (Evans et al. 2012), lait, lactosérum, huiles essentielles (Savocchia et al. 2010), bicarbonate de potassium (Savocchia et al. 2010; Crisp et al. 2006) et la bactérie *Bacillus subtilis* (Crisp et al.

2006). Certaines de ces alternatives sont prometteuses cependant elles sont encore en développement (Savocchia et al. 2010; Crisp et al. 2006).

2.1.2 Le mildiou

Le mildiou est également originaire d'Amérique du Nord et affecte tous les organes herbacés de la vigne (Dubos 2002). Les zones touchées des jeunes feuilles arborent le faciès « tache d'huile » (Figure 6 a) qui sera amené soit à se nécroser par temps sec, soit à se recouvrir de fructifications blanches sur la face inférieure par temps humide (Figure 6 b). Des attaques sévères entrainent la défoliation complète de la plante. Le mildiou diminue le rendement et la qualité des grappes (Figure 6 c). Cette pathologie réduit également la vitalité de la plante l'année suivante puisque la perte de feuilles diminue l'accumulation des réserves amylacées dans les sarments. L'oomycète *Plasmopara viticola* (Berk. et Curt.) Berlese et De Toni est responsable du mildiou de la vigne. La reproduction sexuée forme des oospores qui hibernent dans les feuilles infectées tombées au sol. Cet oomycète peut également survivre à l'hiver sous forme de mycélium dans les bourgeons dormants. Des mesures de prophylaxie et différents fongicides permettent de contrôler ce pathogène (Dubos 2002; Gessler et al. 2011).

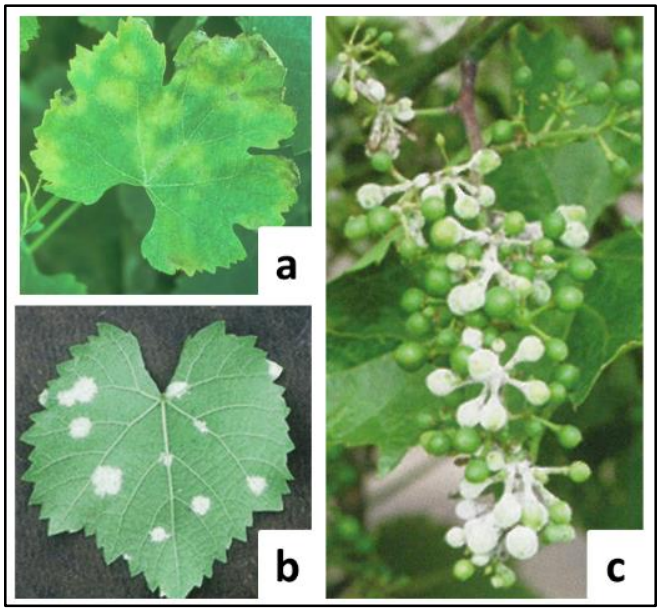


Figure 6 Face supérieure (a), face inférieure (b) des feuilles et baies (c) touchées par le mildiou de la vigne. Source (http://www7.inra.fr/hyp3).

Des acariens auxiliaires pourraient contrôler la microflore de la surface des feuilles de vigne, dont *Plasmopara viticola* (English-Loeb et al. 1999; Pozzebon and Duso 2008). *Lysobacter capsici* AZ78 est une bactérie capable de contrôler les populations de *Plasmopara viticola* sur

les feuilles de vigne tout en persistant sur cette niche écologique car cette espèce tolère les fortes concentrations de cuivre (Puopolo et al. 2014). *Trichoderma harzianum* T39 (Banani et al. 2014) ainsi que des extraits de *Yucca schidigera* et *Salvia officinalis* sont des candidats intéressant au contrôle de ce pathogène parmi plus de 100 agents biotiques et abiotiques testés (Dagostin et al. 2011).

2.1.3 La pourriture grise

La pourriture grise est présente aussi bien en pépinière viticole (maladie de la toile) qu'au vignoble. En pépinière le champignon *Botrytis cinerea* se développe dans les caisses contenant les plants greffés-soudés, profitant des conditions chaudes et humides nécessaires durant la stratification. La pourriture grise peut ainsi gêner la bonne soudure des plants greffés. Toutes les parties herbacées de la plante sont touchées : jeunes rameaux (Figure 7 b), feuilles, les différentes étapes de la floraison, pédicelles et rachis des grappes, ainsi que les baies dès la véraison (Figure 7 a).



Figure 7 Baies (a) et sarment (b) atteints de pourriture grise. Source (http://www7.inra.fr/hyp3).

Le champignon impliqué est *Botrytis cinerea* Pers., un polyphage nécrotrophe présent sur énormément de plantes cultivées et hivernant sous forme de sclérotes sur les rameaux. Outre la prophylaxie, les fongicides anti-botrytis ont tous une action préventive (Dubos 2002). Des outils de contrôle biologique ont été testés. La laminarine est un β-1,3-glucane induisant des défenses au niveau des feuilles de la vigne et diminuant le développement de *B. cinerea* ainsi que *P. viticola* (Aziz et al. 2003). Des bactéries sont également utilisées afin de contrôler ce pathogène telles que les souches B-781 (Paul et al. 1998), *Acinetobacter lwoffii* PTA-113 et

Pseudomonas fluorescens PTA-CT2 (Magnin-Robert et al. 2007), ainsi que des rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* (Varnier et al. 2009). Les espèces de champignons *Trichoderma harzianum* T39 (Meyer et al. 1998) et *Pichia membranifaciens* FY-101 (Masih et al. 2001) ont été testées afin de contrôler *B. cinerea*.

2.1.4 L'excoriose

L'excoriose apparait une quinzaine de jours après le débourrement sous la forme de taches noires qui évolueront en nécroses, en croûtes noires ou enfin en lésions brun-marron étendues et striées perpendiculairement au sarment (faciès tablette de chocolat Figure 8).



Figure 8 Sarment atteint d'excoriose. Source (http://www7.inra.fr/hyp3).

L'excoriose entraine des pertes quantitatives de récolte, jusqu'à 13%. L'ascomycète associé est *Phomopsis viticola* Sacc. La présence de celui-ci en pépinière cause d'importants dégâts. Ce pathogène passe l'hiver sous forme de mycélium et de pycnides sur l'écorce, mais également sous forme de mycélium dans les bourgeons dormants (Dubos 2002).

2.1.5 La flavescence dorée

La flavescence dorée est une maladie importante, inscrite sur la liste des maladies de quarantaine, causée par différents phytoplasmes pouvant se développer dans différentes plantes hôtes dont *Vitis vinifera* L. (Filippin et al. 2009). La transmission de plante à plante dépend d'un insecte vecteur originaire d'Amérique, la cicadelle *Scaphoideus titanus* Ball. (Figure 9 b), dont le cycle dépend exclusivement de la vigne.

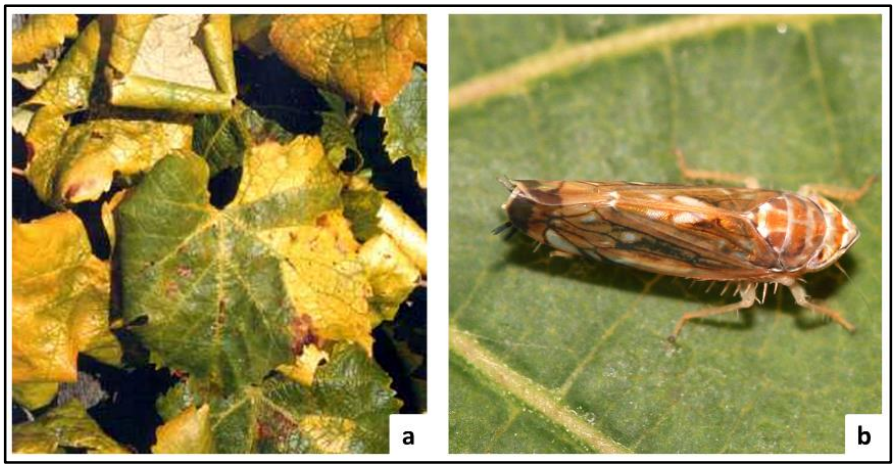


Figure 9 Feuilles souffrant de la flavescence dorée (a) dont le vecteur est la cicadelle Scaphoideus titanus (b). Sources: (a) http://www.srpv-centre.com, (b) http://fr.wikipedia.org.

La lutte contre la flavescence dorée repose sur la connaissance et le contrôle des populations de cicadelles au vignoble (Angelini et al. 2001; Linder and Jermini 2007). Les dommages causés par la cicadelle n'entrainent pas de pertes. Cependant des épidémies de flavescence dorée sont occasionnées par la présence simultanée des cicadelles avec les phytoplasmes. La vigueur des plantes est diminuée, les feuilles s'enroulent et leurs nervures jaunissent (Figure 9 a) (http://www.vignevin.com).

2.2 LES PRINCIPALES MALADIES DU BOIS DE LA VIGNE

Les maladies du bois de la vigne sont devenues préoccupantes durant les vingt dernières années. Trois maladies sont plus précisément décrites et étudiées. Il s'agit de l'eutypiose, de l'esca et du Black Dead Arm (BDA). Ces maladies vasculaires sont associées à des champignons inféodés aux vaisseaux du xylème (Bertsch et al. 2013).

2.2.1 L'eutypiose

L'ascomycète généraliste *Eutypa lata* (Pers. :Fr.) Tul. & C. Tul (anamorphe *Libertella blepharis* A. L. Smith) colonise le tronc de plus de 80 espèces de ligneux. Les vignes atteintes d'eutypiose présentent un rabougrissement sévère des rameaux (Figure 10 a-b). Les feuilles de ces rameaux sont chlorotiques et développent des nécroses en périphérie du limbe et entre les nervures. Les spores sont produites toute l'année et dispersées lorsqu'un épisode pluvieux dépasse 0.5 mm. Le phytopathogène envahit les tissus vasculaires du tronc via les plaies de taille (Jiménez-Teja et al. 2006). Le xylème infecté présente une nécrose brune en forme de V

(Figure 10 c). Les métabolites secondaires nécessaires à l'infection par *E. lata* ont été caractérisés. Il s'agit de composés acétyléniques et hétérocycliques. L'eutypine, 1,4-hydroxy-3-(3-methylbut-3-ene-1-ynyl) benzaldehyde, est la phytotoxine principale produite par *E. lata* (Jiménez-Teja et al. 2006).



Figure 10 Les symptômes au niveau du bois et des feuilles de Vitis vinifera atteintes d eutypiose (a-c), d'esca (d-f) et de Black Dead Arm également appelé chancre à Botryosphaeria (g-k). Planche issue de Bertsch et al. (2013).

Des composés découlant de la même voie de biosynthèse (eutypinol, siccayne, acide eutypinique, eutypoxideB) ont également été isolés à partir de cultures sur boites et possèdent différentes cibles dans la vigne (Andolfi et al. 2011). Les postulats de Koch ont été validés pour cette maladie. *E. lata* a également été isolé dans le bois de vignes présentant des signes avancés d'esca. Cette espèce ferait donc partie des microorganismes pionniers formant le complexe fongique associé à l'esca (Bertsch et al. 2013).

2.2.2 Le Black Dead Arm

Historiquement le BDA est connu sous la forme de lente apoplexie. János Lehoczky décrit pour la première fois cette maladie en Hongrie durant les années 1970 afin de la différencier des symptômes causés par *Phomopsis viticola* (Lehoczky 1974). L'impact du BDA sur la production est difficile à estimer. Des symptômes de feuilles tigrées proches des symptômes d'esca mais sans présence d'une bande jaune chlorosée entre la nervure et le limbe nécrosé rouge sont observés (Figure 10 g). Les symptômes foliaires de Black Dead Arm sont très proches de ceux de l'esca (Figure 10 g-k). La différence entre les deux maladies est sujette à débat. En effet le réseau épidémiologique de surveillance du vignoble français ne fait pas la différence entre les symptômes foliaires d'esca et de BDA lors de ces recensements (Grosman and Doublet 2012). D'autre part l'observation continue de feuilles symptomatiques laisse penser que les symptômes de BDA évolueraient en symptômes d'esca (Lecomte et al. 2012). Ce pathosystème semble également complexe et les *Botryosphaeriaceae* sont également isolés dans les chancres bruns associés à des symptômes foliaires d'eutypiose (Urbez-Torres et al. 2006), donc avec *E. lata* (Figure 10 i). Le bois infecté présente des nécroses sectorielles en forme de V. Cette nécrose sectorielle est parfois visible extérieurement sous la forme d'une bande noire (Figure 10 h) parcourant le long du tronc des ceps (Larignon et al. 2009). Il existe 21 espèces appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae* capables de coloniser le bois de la vigne (Urbez-Torres 2011). Les *Botryosphaeriaceae* ont également été isolés dans les plantes présentant les symptômes d'esca. Parmi les espèces les plus fréquemment isolées figurent *Diplodia seriata*, *Botryosphaeria obtusa*, *Diplodia mutila* et *Neofusicoccum parvum*. Ces espèces causent des chancres dans de nombreuses espèces de fruitiers. La sporulation a lieu durant la période végétative en France, en hiver en Californie, et semble être indépendante de la pluviométrie. La voie d'entrée de ces pathogènes est incertaine, cependant l'infection via les plaies de taille est fortement suspectée. Les plantes atteintes

présentent une mortalité et un retard de croissance des rameaux (Urbez-Torres & W D Gubler 2009). Toutefois des bourgeons de *Vitis vinifera* cv. Chardonnay et Shiraz infectés par des conidies de *D. seriata* and *N. parvum* n'ont pas présenté de mortalités significativement différentes sous serre (Wunderlich et al. 2011). Les postulats de Koch ne sont toujours pas validés afin d'associer de manière certaine les espèces de *Botryosphaeriacae* aux symptômes de BDA (Larignon et al. 2009; Urbez-Torres et al. 2006; van Niekerk et al. 2004). Certaines phytotoxines sécrétées par les espèces fréquemment isolées dans le bois de vigne exprimant le BDA sont connues. Différents composés appartenant à la famille des mélléines sont caractéristiques des *Botryosphaeriaceae* colonisant le bois (Bertsch et al. 2013; Andolfi et al. 2011).

2.2.3 L'esca

Le terme esca est employé généralement pour caractériser des ceps de vigne présentant des décolorations foliaires particulières (Figure 10 d) ou bien le dépérissement soudain du cep (Figure 10 e). Ces deux formes d'expressions foliaires de cette maladie du bois apparaissent après plusieurs années, lorsque la dégradation du bois est déjà bien avancée. Cependant le(s) pathosystème(s) associé(s) à l'esca est (sont) complexe(s). Différents pathogènes sont associés, leurs rôles globalement peu connus, et cette composition varie suivant le stade phénologique des ceps ainsi que leur état sanitaire. « L'esca proper », ou amadou, correspond à la pourriture centrale blanche observable dans les ceps sévèrement atteints (Figure 10 f). Le basidiomycète *Fomitiporia mediterranea* est associé à « l'esca proper » (Fischer 2006). Les organismes pionniers impliqués dans le long développement de cette maladie sont *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* ainsi que d'autres espèces du genre *Phaeoacremonium*. Ces organismes pionniers causent des nécroses, des décolorations ou des ponctuations dans le bois des vignes nommées « young esca ». Le développement de « young esca » n'induit pas nécessairement l'expression de symptômes foliaires. Les symptômes de décoloration des feuilles caractérisent la dernière symptomatologie associée à l'esca : la GLSD (Grapevine Leaf Stripped Disease). L'étiologie de la maladie est peu comprise (Bertsch et al. 2013). La partie 3 de cette introduction est dédiée à la définition de l'esca et la description de ce pathosystème. Les moyens de luttes disponibles ou en cours de développement y seront présentés.

3 L'ESCA : DESCRIPTION DU PATHOSYSTEME ET MOYENS DE LUTTE

3.1 LE(S) PATHOSYSTÈME(S) ASSOCIÉ(S) À L'ESCA

3.1.1 Généralités

L'esca est un pathosystème complexe et un fléau affectant le tronc des vignes. Les symptômes varient en fonction de l'âge de la plante, de la sévérité de l'infection et du contexte pédoclimatique. L'occurrence de l'esca a augmenté durant les dix dernières années et cette maladie a progressé du sud vers les régions du nord. Des études récentes ont permis d'identifier les pathogènes impliqués. Cependant, des plantes infectées peuvent demeurer asymptomatiques et les mécanismes impliqués dans l'expression foliaire de la maladie sont peu compris. Approfondir les connaissances de la microflore, la nature des désordres physiologiques chez l'hôte et les défenses de la plante, qui participeraient à la manifestation de la maladie, est essentiel avant de pouvoir développer des moyens de lutte. Mieux comprendre la boîte noire de l'esca, notamment grâce aux approches génomiques, génétiques et métabolomiques, mais également comprendre les niches de colonisation des pathogènes et les processus de l'infection, permettra de mieux appréhender l'esca. Dans la publication suivante intitulée "**In-depth knowledge of the black box of Esca disease in grapevine, a requirement for the complex pathosystem's understanding and for future prospects"** est présenté un état de l'art critique des connaissances actuelles relatives à l'esca, des moyens de lutte en cours de développement ainsi que des perspectives à considérer dans l'étude de cette maladie.

3.1.2 Publication N°1: In-depth knowledge of the black box of Esca disease in grapevine, a requirement for the complex pathosystem's understanding and for future prospects

Romain Pierron[1,2*], Stéphane Compant[3*], Jérôme Pouzoulet[4*], Harald Berger[3], Walter D. Gubler[5], Markus Gorfer[3,6], Angela Sessitsch[3], Joseph Strauss[3,6], and Alban Jacques[1]

[1]*Université de Toulouse, Equipe Vins Viticulture et Œnologie, Département des sciences agronomiques et agroalimentaires, INP-EI Purpan, 75 voie du T.O.E.C. BP57611, 31076 Toulouse cedex 3, France.*

[2]*Université de Toulouse, LGC UMR 5503 (CNRS/UPS/INPT), Dept BIOSYM, INP-ENSAT, 1 avenue de l'Agrobiopole, 31326 Castanet-Tolosan, France.*

[3]*AIT Austrian Institute of Technology GmbH, Bioresources Unit, Health & Environment Department, 3430 Tulln, Austria.*

[4]*University of California Riverside, Department of Botany and Plant Sciences, CA 92521, USA.*

[5]*Department of Plant Pathology, University of California, Davis, CA 95616, USA.*

[6]*University of Natural Resources and Life Sciences, Department of Applied Genetics and Cell Biology, Konrad Lorenz Straße 24 3430 Tulln, Austria.*

*authors contributed equally to this work

In preparation.

Abstract

Esca is a complex and often devastating disease affecting trunks of grapevine. Symptoms can vary depending on plant age, severity of infection and environmental factors. Occurrence of esca increased in the recent decades and the disease has spread from southern to northern regions. Recent findings have provided clues about causal agents involved. However, infected vines can remain asymptomatic, and pathogenic processes involved in esca disease manifestation are still partially elusive. In depth understanding of wood microflora as well as the nature of the host's physiological disorder, which are thought to influence disease manifestation, are therefore crucial before efficient control measures of this disease can be found. Deciphering the esca's black box through multi and meta-approaches, like genomic, genetic and metabolomic tools, as well as understanding the niches of pathogen colonization and infection are needed to better understand this complex disease. Such approaches will lead to the advanced understanding on how the fungi responsible can indeed infect grapevine plants. Here, knowledge on esca disease is critically reviewed, the use of new tools discussed, and future prospects for a better understanding provided.

Introduction

Among grapevine trunk disease, esca is one of the most destructive diseases (12). Esca is having a negative effect on grapevine industries by reducing grape productivity, grape and wine quality, and vineyard longevity (63). This disease became a limiting factor for many production areas around the world, and the current situation has worsened due to climate warming and the ban of sodium arsenite, which had been used during pruning (30, 56). Esca is known as a complex disease affecting grapevine plants in most grape and wine producing countries, i.e. France (18, 39, 58, 67), Italy (26), Spain (7, 75), Portugal (100), Germany (49), Austria (92), California (61), South Africa (116), Australia (40), Mexico (112), China (118) and many others.

But why is the grapevine industry so concerned about esca disease? Symptoms appear two to three months before the harvest, mostly between June and September in Europe and USA and two forms can co-occur in the vineyards. In the chronic form, leaves develop chlorotic interveinal areas that enlarge and give to leaves a characteristic "tiger striped" appearance (Fig. 1B-C) and also results in fruit spotting and reductions in sugar and acids or the imbalance of same.

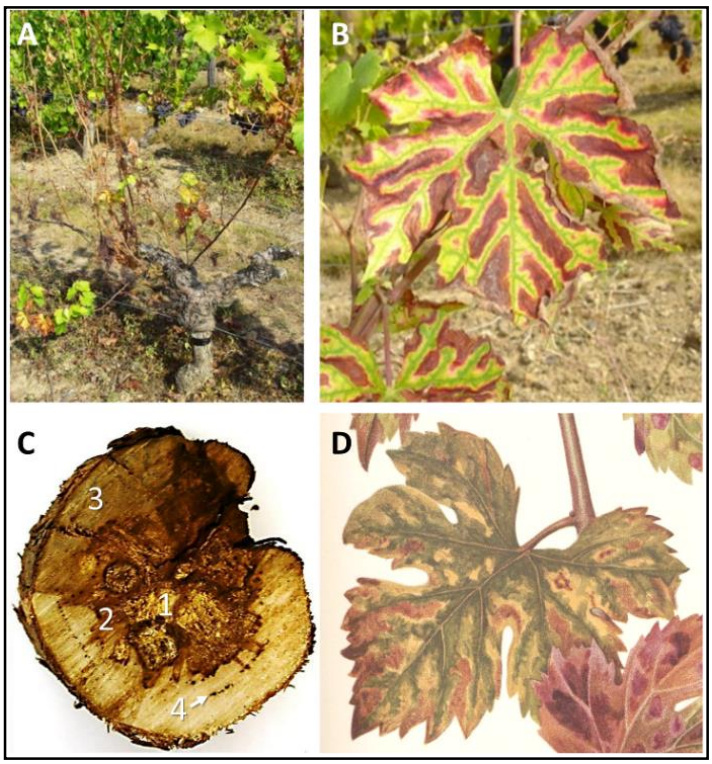


Figure 1 ***Esca related symptoms: today and yesterday.*** *A. The apoplectic or acute form is characterized by a wilting that strikes down the whole plant of Vitis vinifera cv. Cabernet Sauvignon. B. Tiger-striped leaf of Vitis vinifera cv. Cabernet Sauvignon, symptom of the chronic form of esca. C. Trunk symptoms and necrosis. 1: amadou, white rot; 2: central discoloration; 3: sectorial discoloration; 4. Black dots. D. Historical drawing of esca related symptom on leaf named Californian disease (from 116).*

This chronic form of disease reduces the yield and the average quality of grapes from infected vineyards (Fig. 1A). In contrast, the apoplectic or acute form is characterized by a sudden wilting that occurs over the entire vine. This acute form is particularly detrimental because of the cost and the delay of production associated with the replacement of dead vine plants.

"*Esca*" *sensus stricto*, was the word used to name the white rot found in the trunk of mature diseased plants, which had been associated with tiger striped leaves symptoms a century ago, hence the name used now to described foliar symptoms (57). However, the cause of esca (*sensus* "Tiger Striped Leaf Disease"), as it will be discussed further in the manuscript, is due to the extensive colonization of trunk perennial tissue by pathogenic fungi that are not white rotting fungi (106). In mature grapevines (more than 10 years old) suffering from esca, a wide variety of wood discolorations with variable textures can be observed depending on to the extent of structural alteration of lignified cell walls (Fig. 1C). In young vineyards, causal agents associated with esca disease can lead to a decline of plants known as Petri disease (40, 81). For plants expressing esca foliar symptoms, esca proper (104) is distinguished from young esca by the presence of wood decay (47, 83, 105).

Within the trunk infection spreads transversely as well as longitudinally, both downward and upward (83). Cross sections in trunk and arms of diseased vines present black dots, forming long dark streaking in longitudinal in vessel elements (70, 83, 87). In the trunk, or in the tissues next to the barrier separating healthy and effected cells, a pink to brown or dark red to dark brown discoloration may appear surrounding the black lesions or spots (26). Occlusions of xylem vessels by pectin rich compounds (tyloses and gels) impede the progression of fungi by compartmentalization (5, 83). However, occluded vessels are no longer functional, hence reducing water conductivity in infected parts of the xylem. It is also possible that modification of pit membrane properties by toxins secreted in the water conductive stream by fungi might promote the spread of cavitations from gas filled to water filled vessels, resulting in additional lost xylem functionality (13, 111).

Expression of typical “tiger striped” patterns on leaves have also been associated to Bot Cankers (also referred to Black Dead Arm), another trunk pathology commonly found in grapevine. However, continuous observation of symptoms recently revealed that the early expression of foliar symptoms previously attributed to Black Dead Arm disease are transitory phases in the development of esca symptoms (72). However, not only the trunk and the leaves can express symptoms. On white grape cultivars, esca has also been referred as ‘black measles’ because of the small, dark-brown to purple spots that can develop on berries (114).

Infection by esca causal agents can lead to a variety of visual symptoms as described before. This is correlated to the age and the genetic make-up of the host. Interestingly, infected vines expressing the chronic form are able to recover and evade symptom expression for some years. Some studies have reported additionally correlations between the annual rate of vines

showing hidden esca and some abiotic factors, hence highlighting the additional role of the environment in esca disease expression (46). Taking into account the actual spread of this disease, the primary aim is to prevent infection, before curative or mitigate measures are considered. The pathosystem seems, however, highly complex and needs to be far better understood before efficient solutions can be addressed. Epidemiology, metabolomics, genet-/genomics of the suspected causal agents together with infection sites, colonization niches and interactions with the microbiome and plant defense strategies have to be thoroughly studied and the current knowledge is herein reviewed. Due to the complexity of esca and of several forms to be distinguished, the history and origin of the disease as well as all progress related to the disease will be discussed.

Origins of the disease

Although now of strong interest, descriptions of esca-like symptoms may have appeared earlier in history. Presentation in The Natural History of Pliny the Elder mentioned disease(s) originating from roots that leads to the manifestation of red leaf symptoms in grapevine. Interveinal stripe symptoms (tiger stripe) of esca on leaves are so typical, however, that they should have been noticed. “Folletage” and “sunstroke” symptoms were described in early 1900s, and were correlated with “abrupt changes in the bottom water level” (90). At this time, L. Ravaz already associated this symptoms with fungal development in perennial tissues of declining vines (30, 90, 115). Viala (115) described “folletage”, but more interestingly the author dedicated a full part to “the Californian disease(s)”. The description of foliar symptoms of this disease completely matches with the esca disease and the drawing of foliar symptoms is clearly tiger-striped leaves on the same branch (see Figure 1D). Viala mentioned that this pathology has not been observed in France yet but only in California, where he studied the symptoms. He already assumed that this pathology is transferred through cuttings and for this reason exportations of cuttings from California to France were forbidden at this time. In the meantime, Petri associated two species of *Cephalosporium* and one *Acremonium* to brown necrosis in the wood of *Vitis vinifera* L. (30, 62, 80, 87). During the 1950’s, Hewitt showed the discontinuity in symptom expression and Chiarappa associated wood decay fungi and black measles though no symptom expression was ever associated with these fungi. Several species were at that time consistently isolated from symptomatic wood tissues, notably *Cephalosporium* spp. and inoculation tests using one strain of these species reproduced symptoms of black streaking in the wood but observed no foliar symptoms (28, 29, 30). Beginning in the 1980’s researchers started again with esca as a complex pathosystem consisting in an invasion of several fungal agents.

Fungal pathogens involved in esca

Many taxonomically unrelated pathogenic fungi can be isolated from symptomatic woody tissues associated with vine declines (67, 75). It is admitted that esca symptoms are associated with a cocktail of fungi (70, 72) and Koch's postulate has been proved for some isolates (41, 45), at least on trunk symptoms (71), and for some other studies on leaves with fungal toxins (102).

Up to 60 species of fungi belonging to Ascomycota or Basidiomycota can be isolated from symptomatic woody tissues in declining grapevine. However, all of these fungi cannot be directly associated with the disease. Albeit *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* are the principal tracheiphilous hyphomycetes associated with black streaking and brown-red wood (36, 69, 83, 96, 97) fungi that have been associated with esca symptoms in Europe and California include also the wood-rotting lignicolous basidiomycete *Fomitiporia mediterranea*, and occasionally *Stereum hirsutum* (48, 69). Also other fungi, i.e. *Eutypa lata*, and *Botryosphaeriaceae* members, can be isolated from plants showing esca disease (69). The complexity of this microflora leads to a wide diversity and a discrepancy of symptoms in wood of vines showing tiger striped leaves disease and apoplexy.

Koch's postulate

Many studies have demonstrated that symptoms could develop in grapevine wood tissues following inoculation with *P. aleophilum*, *P. chlamydospora*, or *F. mediterranea*, either in combinations or not, thereby fulfilling Koch's postulate for trunk symptoms (11). Co-infection of *P. aleophilum* and *P. chlamydospora* caused wood gummosis and discoloration on an Italian cultivar, whereas *F. mediterranea* alone caused wood deterioration and white rot (102). *P. aleophilum* pathogenicity studies, however, diverged and its ability to produce necrosis and streaking in woody tissue in an invariable way is less clear (71, 75, 88). This, however, does not necessarily mean that it cannot act as a pathogen, as will be discussed further in the review. A recent study has demonstrated that *P. aleophilum* can achieve indeed a high rate of colonization in asymptomatic woody tissues (89). Other studies have shown that development of symptoms in *P. aleophilum* inoculated plants depends on fungal strains, cultivars and incubation time (71, 103, 109). Standing vines, and to a lesser extent vine cuttings are resilient, and can cope with numerous stresses, including trunk diseases. The use of non-lignified grapevine models, like young seedlings, *in vitro*-plantlets and calli, have shown that both *P. chlamydospora* and *P. aleophilum* behave as pathogens within their host (8, 21, 22, 74, 95, 120). Moreover, several studies have addressed the role of toxins produced by *P. aleophilum* and *P. chlamydospora* on the production of the tiger striped leaf symptoms and black measles. All these studies have shown that metabolites secreted in culture media and

in sap of infected vines are able to mimic similar symptoms on detached leaves and berries (21, 22, 24, 25, 74).

Fewer studies used a whole plant approach in order to link *P. aleophilum* and *P. chlamydospora* with foliar symptoms of esca but a main problem to handle in this demonstration is that disease expression requires several years of incubation, and needs to be conducted on standing vines. Pathogenicity assays performed on cuttings and standing vines have, however, also pointed the role of *P. chlamydospora* and *P. aleophilum* in leaf and berry symptoms associated with esca disease (2, 41, 45, 61). Gubler et al. (61) were able to show for instance August symptom development in vines inoculated in February of the same year and concluded that symptom expression probably occurs in the year when new infections of cane or spurs occurred. In Italy, Sparapano and collaborators (103) showed in woody tissues and leaves, that symptoms can be reproduced two years post inoculation with *P. aleophilum* and *P. chlamydospora*. However, the number of vines showing leaf symptoms in this study remained low, and so strong evidence is still lacking. In California, Feliciano et al. (45) clearly demonstrated that symptoms on leaves and berries can be reproduced with *P. aleophilum* as well as *P. chlamydospora* upon inoculation of standing vines. This symptom reproduction was obtained on a particularly susceptible table-grape cultivar (Thompson Seedless) and required three years of observation post-inoculation (45). Such susceptible varieties are cultivated to a lesser extent in Europe, and are not taken into account for pathogenic studies in these countries. The long incubation period required for the disease expression, coupled with the use of relatively tolerant cultivars might explain the lack of conclusions sometimes from European countries on the role of *P. chlamydospora* and *P. aleophilum* on foliar and fruit symptoms, although it has been clearly demonstrated (41, 45, 61).

In the case of the saprophytic basidiomycete (*F. mediterranea*, *F. punctuata*) the presence of white rot does not induce tiger striped leaf symptoms (40, 106), but it is still elusive as to how this fungus can influence and possibly worsen disease expression. Wood decay (white rot) is principally observed in mature vineyards, and develops commonly in heart wood, or in wood functionally compromised by other pathogens. Although, some observations indicate that the presence of basidiomycota impact sap composition of vines already infected by *P. aleophilum* and *P. chlamydospora* (22), their role in disease expression still remain unclear.

Colonization of the grapevine host by esca associated fungi

Several experimental approaches were used to track esca related pathogens in the environment and host tissues (microbiological re-isolation, immunology, microscopy, PCR) and to understand processes of infection and colonization, especially with *P. chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. in grapevine (4, 51, 89). The most widely accepted idea is that *P.*

chlamydospora and *P. aleophilum* behave as airborne pathogens in the vineyard, and are benefitted by pruning wounds that allow them to enter the xylem and then infect plants (59, 93, 94). However, it appears that several other routes of infection exist, and have to be considered. These roles of primary-infection of young plants and/or secondary infection through pruning wounds in the field have been documented experimentally. In a chronological point of view, the first source of contamination can be due to the propagation of material from endophytically infected mother-vines (9, 117). Fungi are also able to contaminate plants in propagation nurseries during the process of grafting plants (55). Then, substantial percentages of infected vines are used to plant new vineyards (53, 89, 119). Observations suggest that one potential route of infection in nurseries is inoculum present in the media and soil. *P. aleophilum* and *P. chlamydospora* can act as soilborne pathogens on young vine plants (3, 8, 46, 89, 91).

Mechanisms of colonization of host tissues by *P. chlamydospora* and *P. aleophilum* have been investigated by several research teams. Even if *P. chlamydospora* and *P. aleophilum* share the same ecological niche, *in vitro* characterization of their enzymatic activities suggest that they have adopted different strategies to succeed in the colonization of their host (113). *In vitro*, both fungi produce tannase, laccase and peroxidase activity, and are able to use tannic acid and resveratrol, two compounds present in grapevine wood and known for their antifungal activities, as a sole source of carbon (23, 113). Other enzymatic activities related to the digestion of cellulo-lignified cell walls (xylanase, endo-β-1,4-glucanase, exo-β-1,4-glucanase, glucosidase, lignin peroxidase) have been found in *P. aleophilum* culturing media, but were absent from *P. chlamydospora* media (113). Histological observations also support these differences of behavior (113). *P. chlamydospora* has been shown to occur principally in xylem vessels and in the lumen of parenchyma cells, but has not been found within the cell walls of the parenchyma or xylem vessels (88, 113). By contrast, ultrastructural approaches using transmission electronic microscopy had shown that *P. aleophilum* is able to colonize cell-walls and then to alter cell wall integrity (113). It is also important to note that despite it is incapable of digesting cell-walls, pectinolytic activity was found for *P. chlamydospora* (66, 77). Pectin being the main component of vessel occluding material, this ability confirms that *P. chlamydospora* could progress in xylem through occluded conduits, without the need to digest host cell walls. Colonization of parenchymatic tissues (xylem fibers and ray parenchyma) was also described (88). The necessity of injury for infection by *P. aleophilum* was investigated also on aseptic single-bud cuttings of cv. Cabernet Sauvignon. The pathogen was able to penetrate uninjured roots and shoots, and colonized its host plant through the intercellular spaces of the epidermis, cortex and pith. It was also shown that *P. aleophilum* seems to colonize xylem tissues and to a lesser extent phloem tissues (46). Electron microscopy has been used to determine that *P. aleophilum* is a vascular pathogen colonizing wood fibers, xylem vessels, and pith (113). Using a FITC-WGA (wheat germ agglutinin) and FITC-labelled serological approaches, Fleurat-Lessard et al. (50) visualized one year after inoculation the fungus in

several members in the trunk of the infected cuttings cv. Cabernet-Sauvignon, mainly in xylem vessels and fibers, but also in protoxylem and pith and in rays. As low infection process occurs with *P. aleophilum*, spreading and crossing from several tissues may require months.

Colonization of grapevine was more frequently studied with *P. chlamydospora* in comparison to *P. aleophilum*. Conidia of *P. chlamydospora* and *P. aleophilum* were retrieved for instance in the xylem sap from discolored wood, and showed high germination rate on water-agar (22). The use of a *DsRed*-labelled *P. chlamydospora* has confirmed a preference for the xylem compared to the pith of Cabernet-Sauvignon and Sauvignon Blanc cuttings (84). Colonization of *Vitis* spp. such as *Vitis vinifera* L. 'Montepulciano', 'Verdicchio', 'Sangiovese', 'Biancame', and 'Cabernet Sauvignon'; and the grapevine rootstocks 'Kober 5BB', 'SO4', '420A', '1103P', and *V. rupestris* by *P. chlamydospora* was additionally studied with a *gfp* marker by Landi et al. (68). The expression of the *Pch*-sGFP71 transformed line was localized in the xylem area, primarily around the vessels. In addition, root colonization by conidial suspension of *P. chlamydospora* was confirmed in 1 year-old cuttings of the rootstock cv. 1103 Paulsen. *P. chlamydospora* colonization was greatest at the root collar level and at the base of the stem. From root inoculation, nine months can be required for *P. chlamydospora* or *P. aleophilum* to progress 25 cm up in the plant, confirming the slow acropetal spread of these pathogens in woody tissues. Initially, *P. chlamydospora* progresses within xylem parenchyma cells until it causes tyloses and/or gums (originating from paratracheal parenchyma) in the vessel lumen, emerging from xylem pits. This was found to be accompanied with the production of phenolic compounds (37, 110).

Using microscopic tools to follow colonization of esca related strains as well as genomic tools different authors have shown that several other microorganisms can be present in the trunk of infected plants. Moreover, the trunk microhabitat can be colonized by a wide variety of different microbes, suggesting some putative microbial and *in planta* interactions during the disease progression and appearance.

Are other fungi can be present in trunk of esca disease plants?

The use of microbiological isolation on semi-selective media is a cost effective and widespread method to detect esca causal agents. However, the fungi show slow growth rates in culture and are frequently overgrown by other competitive microorganisms. Therefore this method leads to a high rate of false negatives. Also other fungi are not taken into account. During the last decade, numerous molecular methods have been developed in order to detect and finally to quantify esca agents in grapevine woody tissues and environmental samples. These

methods were reviewed in detail by Pouzoulet et al. (89). Even though these methods represent a real improvement for the diagnosis of esca disease, they remain nonetheless destructive. Non-invasive approaches, based on immunological detection of exopolysaccharides produced by *P. chlamydospora* in leaves (4), and immunological detection of polypeptides secreted by *P. chlamydospora* (51) and *P. aleophilum* (50) in grapevine sap were also proposed. Among all the diagnostic methods available to date, none of them is perfect, but all of them are complementary. The use of multiple methods might therefore be useful to determine which biotic and/or abiotic factors are governing fungal spread and disease expression. However, many other fungi may be helper or minor players in the disease and could not be taken into account with these methods. Although important players such as *P. chlamydospora, P. aleophilum* or *F. mediterranea* are linked to esca disease, analyses of the plant microbiome associated with esca disease can be of special importance in order to know more about the pathosystems, and if some other microbes can interact with the causal agents of esca disease by reducing or increasing disease progression.

P. chlamydospora is the only species of the genus *Phaeomoniella* that has ever been isolated from grapevine. By contrast, within the genus *Phaeoacremonium*, more than twenty different species have been reported. For instance, in a study of Essakhi et al. (44), phylogenetic analyses of actin and β-tubulin gene sequences revealed that up to 13 species of *Phaeoacremonium* could be isolated from esca diseased grapevines within the Mediterranean area. *P. aleophilum* was the most frequently isolated species with an incidence up to 80 % of all isolates investigated, but *P. alvesii*, and *P. rubrigenum* were also reported on grapevine plants from Turkey and Croatia, respectively. *P.viticola* and *P. scotyli* as well as *P. griseorubrum, P. sicilianum* and *P. tuscanum* were additionally described in Italy and *P. mortoniae, P. croatiense*, as well as *P. hungaricum*, in Hungary and/or Croatia (44). In California, *P. aleophilum* was the most prevalent species isolated from grapevine but other species isolated in California included *P.viticola, P. scotyli, P. rubrigenum, P. mortoniae, P. parasiticum, P inflatipes, P. angustius,* and *P. alvesii*. In addition, sexual fruiting bodies have been found for *P. aleophilum (Togninia minima*) and four other species in California. *Togninia fraxinopennsylvanica* was found on both grapevine and ash trees in the Napa Valley and fruiting bodies were found for two new species of *Phaeoacremonium* in grapevine as well as for *P. viticola* (42, 43).

An extensive survey of fungal microflora associated with grapevine trunks was additionally recently carried out in Switzerland. Data showed that several fungal taxa inhabit the trunk of grapevine with or without symptoms of esca. Hofstetter et al. (65) characterized for instance the fungal microflora in plants expressing esca (as leaf stripe disease symptoms) vs. non disease expressing plants. No differences in the fungal microflora between symptomatic and non-symptomatic plants were detected. According to these authors, the presumed esca associated fungi are only able to decay already senescent or dead wood resulting from abiotic

stresses, intensive pruning, frost or other mechanical injuries, like grafting. However, symptoms in trunk were not taken into account and correlated to fungal community structures. Although the study is interesting from a microbial ecology viewpoint it might be hypothesized that different conclusions would have been drawn if symptoms were taken into account. Interestingly, Bruez et al. (19, 20) compared the grapevine mycoflora between esca-foliar symptomatic and asymptomatic vines, and verified the pathogenic status of the wood tissues to make comparisons. They detected at the fungal order level, a high proportion of Hypocreales, Botryosphaeriales, Eurotiales and Pleosporales in the trunk and rootstocks of esca-foliar symptomatic and asymptomatic grapevines. They also found in high proportion the fungi related to esca disease in trunk expressing symptoms, e.g. *P. aleophilum*, *P. chlamydospora*, and minors players including *F. mediterranea*. It may be possible that other fungi can be correlated with the disease and/or increased or reduced disease progression. It is possible that many other fungi or microbes in general can be indeed correlated to esca disease, although this needs to be proved, especially if tripartite interactions might be associated with esca disease.

Secondary metabolites of the secretome involved in phytopathogenicity

Different microbial taxa have been isolated from esca infected plants but as described before, major players are limited to few taxa. Several metabolites have been interestingly isolated and characterized from these fungi, i.e. *P. aleophilum, P. chlamydospora and from F. mediterranea.* After purification the effects of these compounds have been studied using protoplast, callus or detached leaves of grapevine. From *P. aleophilum* they include pentaketides such as scytalone, isosclerone, *cis*-4-hydroxy-scytalone, 1,3,8-trihydroxynaphtalene, 2,4,8-trihydroxytetralone, 3,4,8-trihydroxytetralone, flavioline, 2-hydroxyjuglone, and 4-hydroxybenzaldehyde (1, 108). From *P. chlamydospora*, scytalone, isosclerone, 4-hydroxybenzaldehyde (108), tyrosol, 1-*O*-methylemodine, 3-hydroxy-5-decanolide, (*S*)-4-hydroxyphenyllactic acid and 4-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyloxy)-benzoic acid have been characterized as parts of the secretome (108). It is known also that *F. mediterranea* produces 4-hydroxy-benzaldehyde, dihydroactinolide and 6-formyl-2,2-dimethyl-4-chromanone (108). *P. chlamydospora* and *P. aleophilum* also produce polysaccharides such as exopolysaccharides (EPSs) (102). The large variety of compounds secreted by the three associated fungi can explain parts of the mechanisms involved in pathogenicity. However, not only the secretome but also genomic information may lead to a novel mechanistic understanding. Recent information using multi-approaches with especially new genomic information has indeed provided new information, which is discussed below.

Genomic information for understanding ecology, infection of esca related fungi

Recent information on fungi associated with esca came from the genome of *P. aleophilum*. A draft of the *P. aleophilum* UCR-PA7 (isolated from a California vineyard) genome sequence, with a total length of 47.5 Mb and 8,926 predicted protein-coding genes was reported by Blanco-Ulate et al. (14). A total of 97% of the fungal genes showed homologies with genes from other ascomycetes and 658 putative secreted proteins were identified. Seventeen genes related to cellulases production, 12 to hemicellulases, 21 to pectin-degrading enzymes, 12 to callose-degrading enzymes, and one gene related to cutinase have been reported, that might play important roles during grapevine tissue colonization and systemic infection. Genes related to 79 cytochrome P450 monooxygenases, two laccases and two lignin peroxidases were also detected, supporting the previous studies related to *P. aleophilum* for its ability to degrade lignocellulose. According to authors, the number of putative lignin-degrading proteins in the *P. aleophilum* genome is however smaller than in other wood-decaying fungi previously described (e.g., *Neofusicoccum parvum*, 212 P450s; *Eutypa lata*, 205 P450s; and *Phanerochaete carnosa*, 266 P450s) (15, 16, 107), suggesting that synergism with other vascular pathogens such as *P. chlamydospora* and *F. mediterranea* during plant infection may favor the effective breakdown of lignified tissues.

The first draft of the *P. chlamydospora* genome sequence was recently published (6) using an isolate from an Austrian vineyard with a total length of 26.59 Mb and 7279 predicted protein-coding genes. Thirty-seven beta glucosidases (cellulose degrading enzymes), five cutinases, three pectinases, ten laccases, one lignin peroxidase and 49 cytochrome P450 monooxygenases are expected with the analysis of this genome. In this strain named RR-HG1, the numbers of genes predicted to be involved in secondary metabolite production such as polyketide synthetases (pks) and nonribosomal peptide synthetases (nrps) are slightly lower (10 pks and 12 nrps) compared to other plant pathogens like e.g. *Fusarium graminearum* with 15 pks (52) and 15 nrps (64). This low diversity in secondary metabolite genes could indicate reduced pathogenicity and explain why grapevine infected by *P. chlamydospora* show symptoms only several years after infection under field conditions.

For *F. mediterranea*, the genome has not been yet described. However, Morgenstern et al. (79) described the presence of *Fmmnp1*, *Fmmnp2*, and *Fmmnp3*, which are genes related to lignin peroxidases. Expression of *mnp* genes in connection with the esca disease has been previously attributed to *P. aleophilum* (38, 82), and a MnP-like peroxidase was reported for *Phaeoacremonium viticola* and *Phaeoacremonium angustius* (85). But *mnp* genes have been also detected in *F. mediterranea*. Manganese peroxidases (MnPs) are the most widespread ligninolytic peroxidases reported and gene expression of these genes could partly explain lignin degradation by the white rot fungus.

Plant defence reactions do not stop the disease

Literature about defence mechanisms implicated in esca disease is poor and erratic. A compatible interaction occurs between *Vitis vinifera* L. and esca associated pathogens, which means that pathogens manage to overcome both constitutive and induced defence mechanisms of their host. To date, no resistant *Vitis* species or cultivars have been found, but some cultivars are known to be more tolerant than others. For instance, field observations have revealed that *Vitis vinifera* L. cv. Merlot can be considered more tolerant than cv. Cabernet Sauvignon (33). Another study has revealed that cv. Cabernet Sauvignon and cv. Chardonnay can be considered more tolerant than cv. Thompson Seedless (45). A recent study tried to address the level of susceptibility of different *Vitis* species and *V. vinifera* L. cultivars by the means of lesion lengths developed in the trunk of cuttings 11 months post-inoculation (109). In this study, no significant difference between lengths of discoloration developed for different cultivars was found for esca associated fungi. Therefore, we wonder whether defence reactions may occur also in other organs than xylem. Sparapano et al. (102) reported differences in length of discoloration developed in trunk of standing vines of cultivars varying in tolerance. The authors also reported differences in response of callus and plantlets (103), suggesting that differences in host responses could be key elements in tolerance towards esca associated fungi. It cannot be excluded that an acute sensitivity to fungal toxins might promote both xylem colonization by reducing local host defences, but also promote development of leaf necrosis once fungal toxins spread systemically and accumulate in green organs.

Trunk colonization by esca-associated fungi results in clear macroscopic symptoms in the wood (72, 83), with delineation of reaction zones which potentially compartmentalizes the infection, as hypothesised in the CODIT model (99). The wood of *Vitis vinifera* L. contains secondary metabolites that are constitutively produced. To disentangle molecular mechanisms responsible for trunk response specificity is essential to understand the role of each fungal agent in esca pathologies (11). Grapevine leaves are responsive to pathogen inoculation in wood (27, 32) and methyl jasmonate treatment (10), however, esca associated fungi do not colonize this tissue but only the trunk and defense responses in trunk have not been shown yet. A survey on the grape cv. Pinot Noir draft genome revealed 233 R-genes coding for proteins presenting both NBS and LRR domains. R-genes are disposed in cluster in the genome creating new resistance specificities (54). In the leaves the simplified signalling cascade involves calcium flux activation, ROS synthesis, MAPKS, or phosphatase activation (54) and may lead to stilbene synthesis (17) such as resveratrol. Stilbenes are associated with the phenylpropanoid pathway, for which marker enzymes are phenylalaline- ammonia-lyases (13 PAL genes in *V. vinifera*), cinnamate-4-hydroxylase (C4H) and 4-coumarate: CoA ligase (4CL). Other enzymes participate later in the pathway and notably stilbene synthase (20-40

STS genes in *V. vinifera* L.), which really conditions the biosynthesis of stilbenes in plant species. They are induced by a wide range of biotic and abiotic stresses (31). Prior to the expression of symptoms metabolite content of infected trunk (78), green stems (101) and leaves (73) is changing and can be linked with different gene expression (101) and a decrease in photosynthetic activity (76, 86). Analysis of the xylem sap content in this different organs indicated also an increase in phenolic compounds in symptomatic plants (22). It is not clear whether this variation results from a perception or is just constitutive. Indeed polyphenols vary both quantitatively and qualitatively in grapevine leaves according their insertion and the age of the plant (98).

Conclusions and future prospects

Considerable information is now available for esca (Fig. 2 sketches a simplify overview of actual knowledge discussed here): genomic information, metabolomics, genomics as well as microbial ecology inside the phytopathosystem. Continuous looks inside the whole parts of the disease as well as individual members can however give more information. For instance, genetic regulation of virulence factors is required. More in-depth knowledge regarding microbial ecology could be also of interest. *In silico* probe design and mathematical models as well as multi-FISH can also give valuable information on which niches and tissues the fungi can colonize and also on how the different partners inside the plants interact.

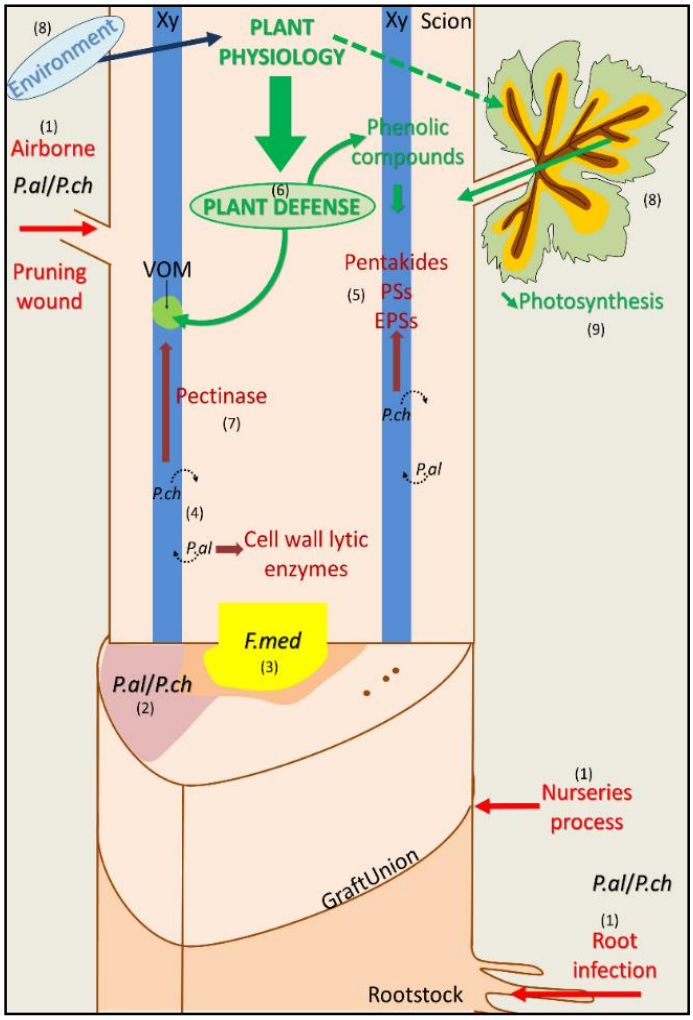


Figure 2 ***Schematic view of esca related knowledge.*** *Xy = xylem; P.ch = P. chlamydospora; P.al = P. aleophilum; F.med = F. mediterranea; PSs = Polysaccharides; EPSs = Exopolysaccharides; VOM = Vessels occluding materials. P. aleophilum and P. chlamydospora would behave as airborne pathogens, taking benefit of pruning wound. It has been shown that fungal propagation could take place during production process in nurseries. Few studies revealed root as a possible entry for fungal agents associated with esca.*

(1) Unknown route of infection: soil inoculum – root infection, airborn pathogens or during nursery processes.

(2) Wood symptoms associated with P. aleophilum and P. chlamydospora are described as sectorial discoloration, central discoloration and black dots.

(3) Esca denomination means "amadou" inside the trunk. This white rot is associated with F. mediterranea.

(4) Present review discuss about potential preference for xylem veins as sit of infection for P. chlamydospora and cortical cell wall for P. aleophilum. It has been shown presence of both pathogens in xylem and cortical tissues time after infection.

(5) Fungal agents were described as secretors of pentakides, polysaccharides and exopolysaccharides.

(6) Plant defenses in esca imply accumulation of vessels occluding materials (VOM, mainly pectins). It has been also shown presence of phenolic compounds accumulating in xylem.

(7) Specifically P. chlamydospora genome studies revealed presence of pectinase enables its progression in xylem veins even if VOM are present.

(8) Environment by interfering with plant physiology should be a major influence on symptoms expression on leaves.

(9) It has been described that a decrease of photosynthesis occurs during esca chronic form.

Additionally co-localization of not only fungi but also tri-partite interactions with other microbes belonging to the grapevine microbiome should be studied. It is well known that grapevine hosts endophytic bacteria that can reside in parts in xylem vessels (such as Bacillaceae and Pseudomonaceae members) as well as its parenchymal tissues (for instance actinomycetes) (35). The number of different bacterial taxa that can be detected inside these tissues is surprisingly high (20). How they can interfere with fungi responsible of esca disease is unclear and has not yet been studied. This might be also true for fungi other than the ones responsible for esca disease. They might be responsible for plant protection during latent phases, might inhibit virulence factors, compete for the same niches, trigger the virulence of the fungi or act as helper microbes. Deciphering the plant defense reaction can also be valuable to understand how the plants can protect themselves. Investigating plant physiology, microbial ecology, microbiology and pathogen genetics/genomics could lead to a better understanding of the esca pathosystem and reveal strategies to control it. Several attempts have been made to control or escape the esca disease but without a better understanding of the phytopathosystem (34), this could be a daunting task. Although beneficial microbes such as *Trichoderma* sp. can help to reduce the disease (84), possible other strategies include targeting fungal gene expression, use of beneficial microbes colonizing same niches within the plants, new potential BCA from other sources, use of mycovirus, use of new rootstock and/or measures to avoid contamination in the nursery. Although esca is an old disease, several studies should be therefore carried out. Deciphering more the black boxes of the disease and the fungal agents involved and to highlight what is hidden is a pre-requisite for an efficient control strategy as well as for basic knowledge.

Acknowledgments

The authors are grateful to French ministry of Education and Research, French Region Midi-Pyrénées (project n°12050499), as well as European Cost action FA1303.

Literature cited

1. Abou-Mansour, E., Couché, E., and Tabacchi, R. 2004. Do fungal naphthalenones have a role in the development of esca symptoms? Phytopathol. Mediterr. 43(1):75-82.

2. Adalat, K., Whiting, C., Rooney, S., and Gubler, W.D. 2000. Pathogenicity of three species of *Phaeoacremonium* spp. on grapevine in California. Phytopathol. Mediterr. 39:92-99.

3. Agustí-Brisach, C., Gramaje, D., García-Jiménez, J., and Armengol, J. 2013. Detection of black-foot and Petri disease pathogens in soils of grapevine nurseries and vineyards using bait plants. Plant Soil 364:5-13.

4. Andolfi, A., Cimmino, A., Evidente, A., Iannaccone, A., Capparelli, R., Mugnai, L., and Surico, G. 2009. A new flow cytometry technique to identify *Phaeomoniella chlamydospora* exopolysaccharides and study mechanisms of Esca grapevine foliar symptoms. Plant Dis. 93(7):680-684.

5. Andolfi, A., Mugnai, L., Luque, J., Surico, G., Cimmino, A., and Evidente, A. 2011. Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. Toxins 3(12):1569-1605.

6. Antonielli, L., Compant, S., Strauss, J., Sessitsch, A., and Berger, H. 2014. Draft genome sequence of *Phaeomoniella chlamydospora* strain RR-HG1, a grapevine trunk disease (Esca) related ascomycota. Genome Announc.2(2):e00098-14.

7. Armengol, J., Vicent, A., Torné, L. García-Figueres, F., and García-Jiménez, J. 2001. Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain : a three-year survey. Phytopathol. Mediterr. 40:S325-S329.

8. Aroca, A., and Raposo, R. 2009. Pathogenicity of *Phaeoacremonium* species on Grapevines. J. Phytopathol. 157(7-8):413-419.

9. Aroca, A., Gramaje, D., Armengol, J., García-Jiménez, J., and Raposo, R. 2010. Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. Eur. J. Plant Pathol. 126(2):165-174.

10. Belhadj, A., Saigne, C., Telef, N., Cluzet, S., Bouscaut, J., Corio-Costet, M.F., and Mérillon,J.M. 2006. Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. J. Agric. Food Chem. 54(24):9119-9125.

11. Bertsch, C., Ramírez-Suero,M., Magnin-Robert,M., Larignon,P., Chong,J., Abou-Mansour,E., Spagnolo,A., Clément,C., and Fontaine, F. 2013. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. Plant Pathol. 62(2):243-265.

12. Bertsch, C., Larignon, P. Sibylle, F., Clément, C., and Fontaine, F. 2009. The spread of grapevine trunk disease. Science 324(5928):721.

13. Blanchette, R.A., and Biggs, A.R. 1992. Defense mechanisms of woody plants against fungi.Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-458.

14. Blanco-Ulate, B., Rolshausen, P. E., and Cantu, D. 2013a. Draft genome sequence of the ascomycete *Phaeoacremonium aleophilum* strain UCR-PA7, a causal agent of the esca disease complex in grapevines. Genome Announc. 1(3):e00390-13.

15. Blanco-Ulate, B., Rolshausen, P. E., and Cantu, D. 2013b. Draft genome sequence of *Neofusicoccum parvum* isolate UCR-NP2, a fungal vascular pathogen associated with grapevine cankers. Genome Announc. 1(3):e00339-13.

16. Blanco-Ulate, B., Rolshausen, P. E., and Cantu, D. 2013c. Draft genome sequence of the grapevine dieback fungus *Eutypa lata* UCR-EL1. Genome Announc. 1(3):e00228-13.

17. Borie, B., Jeandet, P., Parize, A., Bessis, R., and Adrian, M. 2004. Resveratrol and stilbene synthase mRNA production in grapevine leaves treated with biotic and abiotic phytoalexin elicitors. Am. J. Enol. Viticult. 55(1):60-64.

18. Bruez, E., Lecomte, P., Grosman, J., Doublet, B., Bertsch, C., Fontaine, F., Ugaglia, A., Teissedre, J. L., Da Costa, J. P., Guerin Dubrana, L., and Rey, P. 2013. Overview of grapevine trunk diseases in France in the 2000s. Phytopathol. Mediterr. 52(2):262-275.

19. Bruez, E., Vallance, J., Gerbore, J., Lecomte, P., da Costa, J.P., Guerin-Dubrana, L., and Rey, P. 2014. Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of esca leaf-symptomatic and asymptomatic vines. PloS One 9(5):e95928.

20. Bruez, E., Vallance, J., Gerbore, J., Lecomte, P., Guérin-Dubrana, L., and Rey, P. 2011. Characterization of endophytic microflora colonizing wood tissues of healthy and Esca-diseased vines. Phytopathology101(6):S21.

21. Bruno, G., and Sparapano, L. 2007a. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: I. Characterization of secondary metabolites in culture media and host responses to the pathogens in calli. Physiol. Mol. Plant Pathol. 69(4-6):209-223.

22. Bruno, G., and Sparapano, L. 2007b. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: II. Characterization of biomolecules in xylem sap and leaves of healthy and diseased vines. Physiol. Mol. Plant Pathol. 69(4-6):195-208.

23. Bruno, G., and Sparapano, L. 2007c. 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(4-6):182-194.

24. Bruno, G., and Sparapano, L. 2007d. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: V. Changes in the chemical and biological profile of xylem sap from diseased cv. Sangiovese vines. Physiol. Mol. Plant Pathol. 71(4-6):210-229.

25. Bruno, G., Sparapano, L., and Graniti, A. 2007. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: IV. Diffusion through the xylem of metabolites produced by two tracheiphilous fungi in the woody tissue of grapevine leads to esca-like symptoms on leaves and berries. Physiol. Mol. Plant Pathol. 71(1-3):106-124.

26. Calzarano, F., and Di Marco, S. 2007. Wood discoloration and decay in grapevines with esca

proper and their relationship with foliar symptoms. Phytopathol. Mediterr. 46(1):96-101.

27. Camps, C., Kappel, C., Lecomte, P., Léon, C., Gomès, E., Coutos-Thévenot, P., and 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.

28. Chiarappa, L. 1959. Wood decay of the grapevine and its relationship with black measles disease. Phytopathology 49(1):510-519.

29. Chiarappa, L. 1997. *Phellinus igniarius*: the cause of spongy decay of black measles ("esca") disease of grapevines. Phytopathol. Mediterr. 36(2):109-111.

30. Chiarappa, L. 2000. Esca (black measles) of grapevine. An overview. Phytopathol. Mediterr. 39(1):11-15.

31. Chong, J., Poutaraud, A., and Hugueney, P. 2009. Metabolism and roles of stilbenes in plants. Plant Sci. 177(3):143-155.

32. Chong, J., Le Henanff , G., Bertsch, C., and Walter, B. 2008. Identification, expression analysis and characterization of defense and signaling genes in *Vitis vinifera*. Plant Physiol. Biochem. 46(4):469-481.

33. Christen, D., Schönmann, S., Jermini, M., Strasser, R. J., and Défago, G. 2007. Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by *in situ* chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. Environ. Exp. Bot. 60(3):504-514

34. Compant, S., and Sessitsch, A. 2013. En route pour des stratégies innovantes pour la santé de la vigne et de nouveaux agents de lutte biologique. Rev. Oenol. Tech. Vit. Oenol. 40(148):7-8.

35. Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J.G., Gangl, H., and Sessitsch, A.2011. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. Microbial Ecol. 62(1):188-197.

36. Crous, P.W., and Gams, W. 2000. *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. Phytopathol. Mediterr. 39:112-118.

37. del Río, J. A., Gonzalez, A., Fuster, M. D., Botia, J. M., Gomez, P., Frias, V., and Ortuño, A. 2001. Tylose formation and changes in phenolic compounds of grape roots infected with *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* species. Phytopathol. Mediterr. 40(3):S394-S399.

38. del Río, J.A., Gómez, P., Báidez, A., Fuster, M. D., Ortuño, A., and Frias, V. 2004. Phenolic compounds have a role in the defence mechanism protecting grapevine against the fungi involved in Petri disease. Phytopathol. Mediterr. 43(1):87-94.

39. Dupont, J., Laloui, W., Magnin, S., Larignon, P., and Roquebert, M.-F. 2000. *Phaeoacremonium viticola*, a new species associated with Esca disease of grapevine in France. Mycologia 92(3):499-504.

40. Edwards, J., Marchi, G., and Pascoe, I.G. 2001. Young esca in Australia. Phytopathol. Mediterr. 40(3):S303-S310.

41. Eskalen, A., Feliciano, A.J., and Gubler, W.D. 2007. Susceptibility of grapevine pruning wounds and symptom development in response to infection by *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora*. Plant Dis. 91(9):1100-1104.

42. Eskalen, A., Rooney-Latham, S., and Gubler, W.D. 2005a. First report of perithecia of *Phaeoacremonium viticola* on grapevine (*Vitis vinifera*) and ash tree (*Fraxinus latifolia)* in California. Plant Dis. 89(6):686.

43. Eskalen, A., Rooney-Latham, S., and Gubler, W.D. 2005b. Occurrence of *Togninia fraxinopennsylvanica* on esca-diseased grapevine (*Vitis vinifera*) and declining ash trees (*Fraxinus latifolia*) in California. Plant Dis. 89:528.

44. Essakhi, S., Mugnai, L., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., and Surico, G. 2008. Molecular and phenotypic characterisation of novel *Phaeoacremonium* species isolated from esca diseased grapevines. Persoonia 21:119-134.

45. Feliciano, A. J., Eskalen, A., and Gubler, W.D. 2004. Differential susceptibility of three grapevine cultivars to *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora* in California. Phytopathol. Mediterr. 43:66-69.

46. Feliciano, A., and Gubler, W.D. 2001. Histological investigations on infection of grape roots and shoots by *Phaeoacremonium* spp. Phytopathol. Mediterr. 40:S387-S393.

47. Fischer, M. 2002. A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). Mycol. Progr. 1(3):315-324.

48. Fischer, M. 2006. Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine: a worldwide perspective. Phytopathol. Mediterr. 45:S30-S42.

49. Fischer, M., and Kassemeyer, H.-H. 2003. Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany. Vitis 42(3):109-116.

50. Fleurat-Lessard, P., Luini, E., Berjeaud, J.M., and Roblin, G. 2014. Immunological detection of *Phaeoacremonium aleophilum*, a fungal pathogen found in esca disease. Eur. J. Plant Pathol. 139:137-150.

51. Fleurat-Lessard, P., Luini, E., Berjeaud, J.M., and Roblin, G. 2010. Diagnosis of grapevine esca disease by immunological detection of *Phaeomoniella chlamydospora*. Aust. J. Grape Wine Res. 16(3):455-463.

52. Gaffoor, I., and Trail, F. 2006. Characterization of two polyketide synthase genes involved in Zearalenone biosynthesis in *Gibberella zeae*. Appl. Environ. Microbiol. 72(3):1793-1799.

53. Giménez-Jaime, A., Aroca, A., Raposo, R., García-Jiménez, J., and Armengol, J. 2006. Occurrence of fungal pathogens associated with grapevine nurseries and the decline of young vines in Spain. J. Phytopathol. 154(10):598-602.

54. Gomès, E., 2009. Molecular aspects of grapevine-pathogenic fungi interactions. In K. A. Roubelakis-Angelakis (ed.) Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 407-428.

55. Gramaje, D., and Armengol, J. 2011. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. Plant Dis. 95(9):1040-1055.

56. Graniti, A., Surico, G., and Mugnai, L. 2000. Esca of grapevine: a disease complex or a complex of diseases? Phytopathol. Mediterr. 39:16-20.

57. Graniti, A. 2006. From 'fire esca' to 'esca of grapevine'. Phytopathol. Mediterr. 45(4):S5-S11.

58. Grosman, J., and Doublet, B. 2012. Maladies du bois de la vigne: Synthèse des dispositifs d'observation au vignoble, de l'observatoire 2003-2008 au réseau d'épidémiosurveillance actuel. Phytoma 651:31-35.

59. Gubler, W. D., Eskalen, A., Feliciano, A. J., and Khan, A. 2001. Susceptibility of grapevine pruning wounds to *Phaeomoniella chlamydospora*. Phytopathol. Mediterr. 40:482-483.

60. Gubler, W.D., Baumgartner, K., Browne, G.T., Eskalen, A., Rooney Latham, S., Petit, E., and Bayramian, L.A. 2004a. Root diseases of grapevines in California and their control. Aust. Plant Pathol. 33(2):157-165.

61. Gubler, W.D., Thind, T.S., Feliciano, A. J., and Eskalen, A. 2004b. Pathogenicity of *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora* on grape berries in California. Phytopathol. Mediterr. 43:70-74.

62. Gubler, W.D., and Schnathorst, W. 1991. Black measles. *In*: Grape Pest Management, 2nd Ed., Univ. of California IPM Manual. D. L. Flaherty, et al. (eds.).

63. Guerin-Dubrana, L., Labenne, A., Labrousse, J.C., Bastien, S., Rey, P., and Gegout-Petit, A. 2013. Statistical analysis of grapevine mortality associated with esca or Eutypa dieback foliar expression. Phytopathol. Mediterr. 52(2):276-288.

64. Hansen, F.T., Sørensen, J.L., Giese, H., Sondergaard, T.E., and Frandsen, R.J.N.2012. Quick guide to polyketide synthase and nonribosomal synthetase genes in *Fusarium*. Int. J. Food Microbiol. 155(3):128-136.

65. Hofstetter, V., Buyck, B., Croll, D., Viret, O., Couloux, A., and Gindro, K. 2012. What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? Fungal Divers. 54:51-67.

66. Klosterman, S.J., Subbarao, K.V., Kang, S., Veronese, P., Gold, S.E., Thomma, B.P.H.J., Chen, Z., Henrissat, B., Lee, Y.H., Park, J., Garcia-Pedrajas, M.D., Barbara, D.J., Anchieta, A., de Jonge, R., Santhanam, P., Maruthachalam, K., Atallah, Z., Amyotte, S.G., Paz, Z., Inderbitzin, P., Hayes, R.J., Heiman, D.I., Young, S., Zeng, Q., Engels, R., Galagan, J., Cuomo, C.A., Dobinson, KF., and Ma, L.-J. 2011. Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens. PLoS Pathog. 7(7):e1002137.

67. Kuntzmann, P., Villaume, S., Larignon, P., and Bertsch, C. 2010. Esca, BDA and Eutypiosis: foliar symptoms, trunk lesions and fungi observed in diseased vinestocks in two vineyards in Alsace. Vitis 49(2):71-76.

68. Landi, L., Murolo, S., and Romanazzi, G. 2012. Colonization of *Vitis* spp. wood by sGFP-transformed *Phaeomoniella chlamydospora*, a tracheomycotic fungus involved in Esca disease. Phytopathology 102(3):290-297.

69. Larignon, P., and Dubos, B. 1997. Fungi associated with esca disease in grapevine. Eur. J. Plant Pathol. 103(2):147-157.

70. Larignon, P., Fontaine, F., Farine, S., Clément, C., and Bertsch, C. 2009. Esca et Black Dead Arm : deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la Vigne "Esca and Black Dead Arm: two major actors of grapevine trunk diseases". C.R. Biologies332:765-783.

71. Laveau, C., Letouze, A., Louvet, G., Bastien, S., and Guerin-Dubrana, L. 2009. Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. Phytopathol. Mediterr. 48(1):32-46.

72. Lecomte, P., Darrieutort, G., Liminana, J.-M., Comont, G.,Muruamendiaraz, A.,Legorburu, F.-J., Choueiri, E., Jreijiri, F., El Amil, R.,and Fermaud, M. 2012. New insights into Esca of grapevine: the development of foliar symptoms and their association with xylem discoloration. Plant Dis. 96(7):924-934.

73. Lima, M.R.M., Felgueiras, M.L., Graça, G., Rodrigues, J.E., Barros, A., Gil, A.M., and Dias, A.C.P. 2010. NMR metabolomics of esca disease-affected *Vitis vinifera* cv. Alvarinho leaves. J. Exp. Bot. 61(14):4033-4042.

74. Luini, E., Fleurat-Lessard, P., Rousseau, L., Roblin, G., and Berjeaud, J.M. 2010. Inhibitory effects of polypeptides secreted by the grapevine pathogens *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on plant cell activities. Physiol. Mol. Plant Pathol. 74 (5-6):403-411.

75. Luque, J., Martos, S., Aroca, A., Raposo, R., and García-Figueres, F. 2009. Symptoms and fungi associated with declining mature Grapevine plants in northeast Spain. J. Plant Pathol. 91 (2):381-390.

76. Magnin-Robert, M., Letousey, P., Spagnolo, A., Rabenoelina, F., Jacquens, L., Mercier, L., Clément, C., and Fontaine, F. 2011. Leaf stripe form of esca induces alteration of photosynthesis and defence reactions in presymptomatic leaves. Funct. Plant Biol. 38(11):856-866.

77. Marchi, G., Roberti, S., d'Ovidio, R., Mugnai, L., and Surico, G. 2001. Pectic enzymes production by *Phaeomoniella chlamydospora*. Phytopathol. Mediterr. 40:S407-S416.

78. Martin, N., Vesentini, D., Rego, C., Monteiro, S., Oliveira, H., and Boavida Ferreira, R. 2009. *Phaeomoniella chlamydospora* infection induces changes in phenolic compounds content in *Vitis vinifera*. Phytopathol. Mediterr. 48(1):101-116.

79. Morgenstern, I., Robertson, D. L., and Hibbett, D.S. 2010. Characterization of three mnp genes of *Fomitiporia mediterranea* and report of additional class II peroxidases in the order hymenochaetales. Appl. Environ. Microbiol. 76(19):6431-6440.

80. Mostert, L., Halleen, F., Fourie, P., and Crous, P.W. 2006. A review of *Phaeoacremoniu*m species involved in Petri disease and esca of grapevines. Phytopathol. Mediterr. 45:S12-S29.

81. Mugnai, L., Surico, G., and Esposito, A. 1996. Microflora associata al mal dell'esca della vite in Toscana. Informatore Fitopatologico 46:49-55.

82. Mugnai, L., Surico, G., and Sfalanga, A. 1997. Produzione di enzimi esocellulari da parte di funghi del legno di viti colpite dal 'mal dell'esca'. Micologia Italiana 26:11-22.

83. Mugnai, L., Graniti, A., and Surico, G. 1999. Esca (Black measles) and brown wood-streaking: Two old and elusive diseases of grapevines. Plant Dis. 83(5):404-418.

84. Mutawila, C., Faurie, P.H., Halleen, F., and Mostert, L. 2011. Histo-pathology study of the growth of *Trichoderma harzianum*, *Phaeomoniella chlamydospora* and *Eutypa lata* on grapevine pruning wounds. Phytopathol. Mediterr. 50:S46-S60.

85. Overton, B.E., Stewart, E. L., and Wenner, N. G. 2006. Manganese oxidation in Petri disease fungi as a novel taxonomic character. Phytopathol. Mediterr. 45:S131-S134.

86. Petit, A.-N., Vaillant, N., Boulay, M., Clément, C., and Fontaine, F. 2006. Alteration of photosynthesis in grapevines affected by esca. Phytopathology 96(10):1060-1066.

87. Petri, L., 1912. Osservazioni sopra le alterazioni del logno della vite in seguito a ferite. Staz. Sper. Agric. Ital. 45(1):501-547.

88. Pouzoulet, J., Jacques, A., Besson, X., Dayde, J., and Mailhac, N. 2013a. Histopathological study of response of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon to bark and wood injury with and without inoculation by *Phaeomoniella chlamydospora*. Phytopathol. Mediterr. 52(2):313-323.

89. Pouzoulet, J., Mailhac, N., Couderc, C., Besson, X., Daydé, J., Lummerzheim, M., and Jacques, A. 2013b. A method to detect and quantify *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* DNA in grapevine-wood samples. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97(23):10163-10175.

90. Ravaz, L., 1909. Sur l'apoplexie de la vigne. Prog. Agric. Vitic. 30(1):547-579.

91. Retief, E., McLeod, A., and Fourie, P.H. 2006. Potential inoculum sources of *Phaeomoniella chlamydospora* in South African grapevine nurseries. Eur. J. Plant Pathol. 115(3):331-339.

92. Reisenzein, H., Berger, N., and Nieder, G. 2000. Esca in Austria. Phytopathol. Mediterr. 39(1):26-34.

93. Rolshausen, P., Úrbez-Torres, J. R., Rooney-Latham, S., Eskalen, A., Smith, R., J., and Gubler, W.D. 2010. Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. Am. J. Enol. Vitic. 61(1):113-119.

94. Rooney-Latham, S., Eskalen, A., and Gubler, W.D. 2005. Occurrence of *Togninia minima* perithecia in Esca-affected vineyards in California. Plant Dis. 89:867-871.

95. Santos, C., Fragoeiroa, S., and Phillips, A. 2005. Physiological response of grapevine cultivars and a rootstock to infection with *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* isolates: an *in vitro* approach using plants and calluses. Sci. Hort. 103:187-198.

96. Scheck, H., Vasquez, S.J., Gubler, W.D., and Fogle, D. 1998a. Young grapevine decline in California. Practical Winery and Vineyard, (May/June) 32-38.

97. Scheck, H., Vasquez, S.J., Gubler, W.D., and Fogle, D. 1998b. First report of three *Phaeoacremonium* spp. causing young grapevine decline in California. Plant Dis. 82(5):590.

98. Schoedl, K., Schuhmacher, R., and Forneck, A. 2012. Studying the polyphenols of grapevine leaves according to age and insertion level under controlled conditions. Sci. Hort. 141:37-41.

99. Shigo, A.L., and Marx, H.G. 1977. Compartmentalization of decay in trees. Sci. Amer. 252(4):73.

100. Sofia, J., Gonçalves, M.T., and Oliveira, H. 2006. Spatial distribution of Esca symptomatic plants in Dão vineyards (centre Portugal) and isolation of associated fungi. Phytopathol. Mediterr. 45:S87-S92.

101. Spagnolo, A., Magnin-Robert, M., Alayi, T.D., Cilindre, C., Mercier, L., Schaeffer-Reiss, C., Van Dorsselaer, A., Clément, C., and Fontaine, F. 2011. Physiological changes in green stems of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay in response to Esca proper and apoplexy revealed by proteomic and transcriptomic analyses. J. Prot. Res. 11(1):461-475.

102. Sparapano, L., Bruno, G., and Graniti, B. 2000. Effects on plants of metabolites produced in culture by *Phaeoacremonium chlamydosporum*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. Phytopathol. Mediterr. 39:169-177.

103. Sparapano, L., Bruno, G., and Graniti, B. 2001. Three-year observation of grapevines cross-inoculated with esca-associated fungi. Phytopathol. Mediterr. 40:S376-S386.

104. Surico, G. 2001. Towards commonly agreed answers to some basic questions on esca. Phytopathol. Mediterr. 40:S487-S490.

105. Surico, G., Mugnai, L., and Marchi, G. 2006. Older and more recent observations on esca: a critical overwiev. Phytopathol. Mediterr. 45:S68-S86.

106. Surico, G. 2009. Towards a redefinition of the diseases within the esca complex of grapevine. Phytopathol. Mediterr. 48(1):5-10.

107. Suzuki, H., MacDonald, J., Syed, K., Salamov, A., Hori, C., Aerts, A., Henrissat, B., Wiebenga, A., VanKuyk, P. A., Barry, K., Lindquist, E., LaButti, K., Lapidus, A., Lucas, S., Coutinho, P., Gong, Y., Samejima, M., Mahadevan, R., Abou-Zaid, M., de Vries, R. P., Igarashi, K., Yadav, J. S., Grigoriev, I. V., and Master, E. R. 2012. Comparative genomics of the white-rot fungi, *Phanerochaete carnosa* and *P. chrysosporium*, to elucidate the genetic basis of the distinct wood types they colonize. BMC Genom. 13(1):444.

108. Tabacchi, R., Fkyerat, A., Poliart, C., and Dubin, G.-M. 2000. Phytotoxins from fungi of esca of grapevine. Phytopathol. Mediterr. 39:156-161.

109. Travadon, R., Rolshausen, P.E., Gubler, W.D., Cadle-Davidson, L., and Baumgartner, K. 2013. Susceptibility of cultivated and wild *Vitis* spp. to wood infection by fungal trunk pathogens. Plant Dis. 97(12):1529-1536.

110. Troccoli, L., Calamassi, R., Mori, B., Surico, G., and Mugnai, L. 2001. *Phaeomoniella chlamydospora*-grapevine interaction: histochemical reactions to fungal infection. Phytopathol. Mediterr. 40:S400-S406.

111. Tyree, M. T., and Sperry, J. S. 1989. Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol. 40(1):19-36.

112. Urbez-Torres, J.R. Leavitt, G.M., Guerrero, J.C., Guevara Lugo, J., and Gubler, W.D. 2006. Botryosphaeria canker disease or grapevines caused by *Botryosphaeria rhodina* and *B. obtusa* in Mexico. Phytopathology 96(6):S117-S117.

113. Valtaud, C., Larignon, P., Roblin, G., and Fleurat-Lessard, P. 2009. Developmental and ultrastructural features of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* in relation to xylem degradation in esca disease of the grapevine. J. Plant Pathol. 91(1):37-51.

114. Vasquez, S.J., Gubler, W.D., and Leavitt, G.M. 2007. Economic loss in California's table grape vineyards due to measles. Phytopathol. Mediterr. 46:118.

115. Viala, P., 1893. Les maladies de la vigne (3e édition). C. Coulet, and G. Masson (eds.), pp. 407-411.

116. White, C., Halleen, F., and Mostert, L. 2011. Symptoms and fungi associated with esca in South African vineyards. Phytopathol. Mediterr. 50:S236-S246.

117. Whiteman, S.A., Stewart, A., Ridgway, H.J., and Jaspers, M.V. 2007. Infection of rootstock mother-vines by *Phaeomoniella chlamydospora* results in infected young grapevines. Aust. Plant Pathol. 36(2):198-203.

118. Yan, J.-Y., Li, X.-H., Kong, F.-F.,Wang, Z.-Y., Gong, L.-Z., and He, H.-P. 2011. Occurrence of grapevine

trunk disease caused by *Botryosphaeria rhodina* in China. Plant Dis. 95(2):219-219.

119. Zanzotto, A., Autiero, F., Bellotto, D., Dal Cortivo, G., Lucchetta, G., and Borgo, M. 2007. Occurrence of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* in grape propagation materials and young grapevines. Eur. J. Plant Pathol. 119(2):183-192.

120. Zanzotto, A., Gardiman, M., and Lovat, L. 2008. Effect of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* sp. on *in vitro* grapevine plants. Sci. Hort. 106(4):404-408.

Le nombre d'études concernant l'esca est conséquent (Mugnai et al. 1999; Gramaje and Armengol 2011; Bertsch et al. 2013). Le génome de certains champignons associés à l'esca, dont *P. aleophilum* (Blanco-Ulate 2013), *P. chlamydospora* (Antonielli et al. 2014) et *Fomitiporia mediterranea* (Floudas et al. 2012), est désormais disponible afin d'étudier les gènes impliqués dans la virulence des souches. Les études métabolomiques permettent de connaître les toxines (Andolfi et al. 2011) et les changements physiologiques de la plante (Spagnolo et al. 2011) qui sont impliqués dans l'expression des symptômes foliaires. Une étude de l'écologie microbienne du bois de la vigne révèle que les ordres auxquels appartiennent les champignons associés aux maladies du bois sont présents dans les plantes asymptomatiques et dans les plantes exprimant les symptômes foliaires. Cependant l'analyse des tissus de bois symptomatiques indique une plus forte proportion de pathogènes (Bruez et al. 2014). Le rôle des bactéries dans ces interactions est également intéressant (Bruez 2013) afin de comprendre comment maîtriser ou rétablir les équilibres de la microflore présente dans le bois.

D'autres études restent à entreprendre, notamment concernant la colonisation des différentes espèces de champignons associées à l'esca et comment celles-ci interagissent dans le bois. L'utilisation de gènes marqueurs, tel que le gène codant la GFP, permettent de localiser de manière spécifique *P. chlamydospora* dans le bois de la vigne (McLean et al. 2009; Landi et al. 2012). L'étude de la colonisation de *P. aleophilum* exprimant le gène codant pour la GFP n'a pas été réalisée à notre connaissance. La Wheat Germ Agglutinin (WGA) se lie préférentiellement à la chitine de la paroi des hyphes (Fleurat-Lessard et al. 2014). La WGA couplée avec la sonde AlexaFluor® 488 permettrait de marquer les souches sauvages afin de comparer leur colonisation avec celle des souches transformées.

La réponse physiologique de la plante est également un point crucial dans la compréhension de l'esca. La réponse de la blessure infectée par *P. chlamydospora* a été étudiée en histologie (Pouzoulet et al. 2013). La réponse moléculaire lors de l'apparition des symptômes au vignoble a été étudiée (Spagnolo et al. 2011), cependant la perception du bois de la vigne dans les quelques heures suivant l'infection reste floue. L'induction des défenses dépendra de la capacité de reconnaissance des micro-organismes par le bois. Certains agents de bio-contrôle agiraient de manière indirecte en induisant les défenses de la plante (Banani et al. 2014; Perazzolli et al. 2011). Développer un modèle d'étude des interactions entre le bois de la vigne

et les champignons permettrait donc d'établir de nouvelles connaissances fondamentales. Ces connaissances sont essentielles afin de favoriser le développement de nouveaux moyens de lutte contre l'esca.

3.2 LES MOYENS DE LUTTE CONTRE L'ESCA

3.2.1 Les moyens de lutte chimique

A ce jour il n'existe aucune méthode de lutte efficace pour contrôler l'esca au vignoble. L'arsénite de soude était employé en France jusqu'à son retrait en 2001 à cause de ses effets carcinogènes et de sa toxicité aigüe sur l'environnement (Jha et al. 1992; Kergresse et al. 2011; Azizur Rahman et al. 2012). Ce produit masquait les symptômes foliaires d'esca sans être curatif (Péros et al. 2008). Le développement et l'emploi de différentes techniques complémentaires est donc nécessaire (Bertsch et al. 2013). Les différents fongicides, listés dans la bibliographie réalisée par Bertsch et al. (2013), ont été testés en pépinière ainsi que sous diverses formes d'applications au vignoble, sans grand succès (Fosetyl-Al, iron-umate, microelement-humate 'S' activator, Ca-Mg-B solution, 'S' bioactivator, thiophanate-methyl, propiconazole, difenoconazole, thiabendazole, propiconazole + thiabendazole, cyproconazole, flusilazole, penconazole, fosetyl-Ca et tetraconazole). L'application d'une formulation à base de cuivre a réduit la germination des conidies de *P. chlamydospora in vitro* sans impact sur la taille des nécroses observées dans des porte-greffes en pots. Cependant l'application au champ de cette formulation trois années consécutives a réduit l'incidence des symptômes de GLSD. L'inhibition de la synthèse de scytalones par *P. aleophilum in vitro* pourrait expliquer la diminution des symptômes foliaires sans réduction de la colonisation du tronc par cette formulation à base de cuivre (Marco et al. 2011).

3.2.2 La prophylaxie en pépinière

A l'heure actuelle, seules les mesures de prophylaxie seraient capables de limiter la progression de l'esca, à la condition de clairement établir le lien entre présence/quantité de pathogènes et le développement de la maladie. Le procédé de fabrication des plants en pépinière (Figure 11) comporte de nombreuses étapes qui pourraient être le lieu de la contamination (Gramaje and Armengol 2011). La bonne qualité sanitaire des plants en sortie de pépinière est donc essentielle. Les plants subissent des traitements fongicides mais également des désinfections dans des bains d'eau chaude (Hot Water Treatment). Les

traitements à l'eau chaude parviennent à diminuer la source d'inoculum des champignons responsables des maladies du bois sans compromettre le débourrement des plants (Fourie and Halleen 2004). Certaines études sont cependant de plus en plus critiques sur l'impact de ces traitements sur la physiologie des jeunes plants de vigne (Waite and Morton 2007).

Diagnostiquer les plants infectés dès la pépinière est le moyen le plus efficace envisageable afin de contrôler l'esca en l'absence d'autres alternatives. Si aucune mesure règlementaire n'a été mise en place pour tester les maladies du bois sur le matériel végétal utilisé par les structures multiplicatrices, des techniques de diagnostic du matériel de base et du matériel certifié sont désormais disponibles (Gramaje & Armengol 2011; Pouzoulet 2012; Pouzoulet et al. 2013).

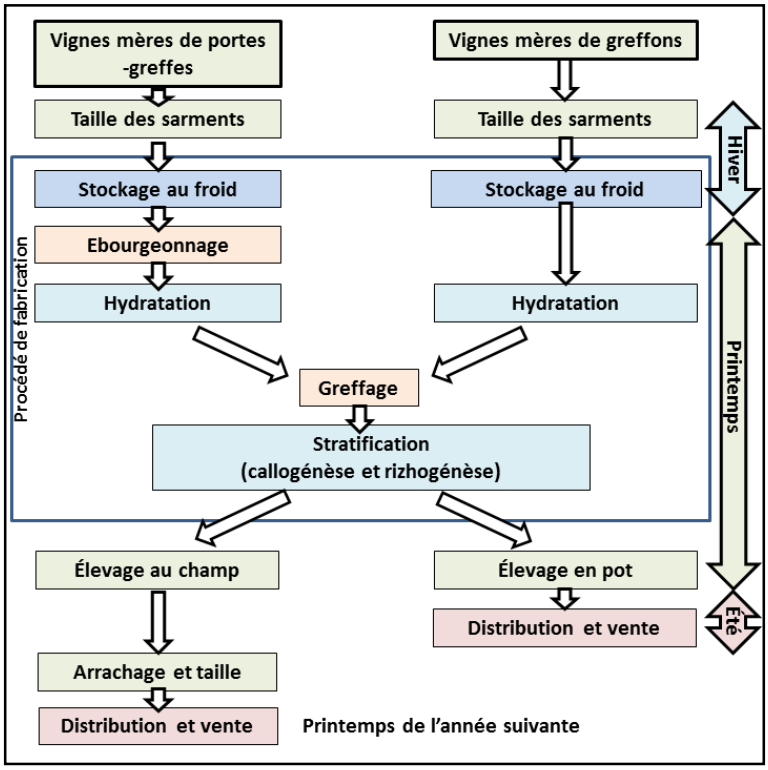


Figure 11 Procédés de fabrication des plants de vigne greffés-soudés en pépinière viticole. (adapté d'après Gramaje & Armengol, 2011).

3.2.2.1 Le diagnostic microbiologique

Le diagnostic classique consiste à isoler les micro-organismes en cultivant des sections de bois de vigne sur des milieux sélectifs. Concernant les maladies du bois, les milieux couramment utilisés sont le PDA (Potato Dextrose Agar), le MEA (Malt Extract Agar) et l'OA (Oatmeal Agar). Ces différents milieux sont supplémentés en antibiotiques à large spectre. Les mycéliums se développant sur boites sont ensuite identifiés selon leurs morphologies. Cette technique est

laborieuse et requiert une expertise en taxonomie des champignons. Seules les espèces cultivables sur boites sont diagnostiquées, avec la nuance que les espèces se développant lentement (notamment *P. aleophilum* et *P. chlamydospora*) risquent d'être masquées par les organismes colonisant rapidement le milieu (Aroca and Raposo 2007). Le progrès des techniques de biologie moléculaire, ainsi que la diminution de leurs coûts, ont orienté la recherche vers le développement d'outils de diagnostic moléculaires des pathologies végétales (Gramaje and Armengol 2011).

3.2.2.2 Le diagnostic moléculaire

La technique de réaction en chaine par polymérase (PCR)

Le diagnostic moléculaire est destructif et repose sur la détection spécifique de l'ADN des pathogènes par PCR (Polymerase Chain Reaction). La majorité des diagnostics des maladies du bois par PCR ciblent des séquences ITS (Internal Transcribed Spacer) des ADNr (Acide RiboNucléique ribosomique) des champignons, plus rarement des séquences codant l'actine ou la β-tubuline (Mostert et al. 2006; Aroca and Raposo 2007). La détection de *P. chlamydospora* a fait l'objet de plusieurs études, certaines étant spécifiques jusqu'au niveau de la souche, et dont la sensitivité a atteint 50 fg (Bertelli et al. 2000; Ridgway et al. 2002; Whiteman et al. 2002)

La technique de réaction en chaine par polymérase quantitative (qPCR)

Bien que la limite de détection de l'ADN fongique par PCR soit faible, cette technique demeure qualitative. Différentes disciplines de la biologie développèrent rapidement le besoin de quantifier les acides nucléiques présents dans l'échantillon au cycle initial de réplication. Le développement de la qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) durant les années 1990 a permis de corréler une mesure de fluorescence émise par le mélange réactionnel avec l'accumulation des produits de PCR, et ce pour chaque cycle de réplication (Higuchi et al. 1993). Puisque la quantification s'opère à chaque cycle, cette technique porte également le nom de PCR en temps réel, ou qPCR étant précédé de l'acronyme RT.

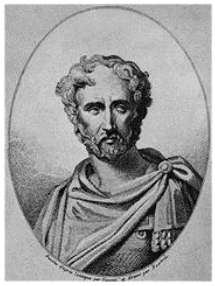
La première application de la qPCR au diagnostic des maladies du bois a permis de détecter une conidie dans un échantillon (Overton et al. 2004). Le diagnostic moléculaire apparaît plus sensible que la détermination taxonomique. Cependant la PCR ne fait pas la distinction entre les ADN provenant de cellules vivantes ou mortes. Ceci rend difficile l'étude de la progression

du champignon dans la plante (Retief et al. 2005). Une étude utilisant la « nested » PCR a permis d'estimer la détection des tissus morts dans un échantillon de sol. Les spores non viables ne sont plus détectées huit semaines après inoculation tandis que la détection de spores actives décroit de 50% dix-sept semaines après inoculation (Ridgway et al. 2005). Par conséquent la détection d'ADN provient plus probablement de matériel vivant et il est donc possible d'associer quantification des ADN fongiques avec la virulence des souches. Enfin la technique de qPCR a été optimisée afin de détecter plusieurs espèces simultanément dans le même mélange réactionnel. La technique en duplex associe une fluorescence particulière à un couple d'amorce spécifique d'une espèce de champignon. Ce procédé s'est révélé deux fois plus sensible que la nested PCR pour la détection des *Phaeoacremonium* spp. (Aroca et al. 2008). L'aspect quantitatif de la qPCR s'est affiné avec la technologie Plexor™. Le transfert de cette technique à la problématique de maladies du bois permet de quantifier trois espèces par qPCR multiplexe (Pouzoulet et al. 2013). Cette technique mesure le niveau de contamination d'un lot de plantes en pépinière ou bien d'une plante au vignoble. Son utilisation ouvre une nouvelle voie dans l'étude de la colonisation des champignons associés aux maladies du bois en conditions de laboratoire (Pouzoulet 2012).

3.2.3 La prophylaxie au vignoble

La prophylaxie consiste à retirer les plantes ou le matériel malade du vignoble. La pratique de la double taille a été testée pour contrôler les maladies du bois de la vigne (Weber et al. 2007; Urbez-Torres and Gubler 2009a). Les outils utilisés lors de la taille doivent être bien affutés afin de blesser la plante le plus nettement possible. Pline l'ancien observa dès l'antiquité (Figure 12) qu'une taille de la vigne mal maitrisée pouvait faire entrer des « influences néfastes » du dehors en dedans de la plaie (Bostock et al. 1855). La technicité de la taille ne doit pas être négligée. La technique, appelée Guyot-Poussard, vise à ne tailler les sarments que sur une face du tronc afin de préserver la continuité des vaisseaux non endommagés sur la face opposée aux plaies de taille (Geoffrion and Renaudin 2002). La prophylaxie présente l'avantage de respecter l'environnement car elle emploie rarement des produits phytosanitaires. Les professionnels du secteur viticole expriment une forte attente concernant le développement de molécules peu rémanentes dans l'environnement ou d'agents de bio-contrôle efficaces contre l'esca.

et calore hoc evenit intempestivo, quoniam omnia modo constant certoque temperamento. fiunt et culpa colentium vitia, cum praestringuntur, ut dictum est, aut circumfossor iniurioso ictu verberavit vel etiam subarator inprudens luxavit radices corpusve desquamavit. sunt et quaedam contusio falcis hebetioris. quibus omnibus causis difficilius tolerant frigora aut aestus, quoniam in ulcus penetrat iniuria omnis a foris. infirmissima vero malus, maximeque quae dulcis est.



Plinius, Historiae Naturalis Liber XVII, XXXVII, 226-227.

Heat, too, out of season, is productive of similar results: for everything is regulated according to a fixed order and certain determinate movements. Some maladies, too, originate in errors committed by the vine-dresser; when they are tied too tight, for instance, as already mentioned, or when in trenching round them the digger has struck them an unlucky blow, or when in ploughing about them the roots have been strained through carelessness, or the bark has been stripped from off the trunk: sometimes, too, contusions are produced by the use of too blunt a pruning-knife. Through all the causes thus enumerated the tree is rendered more sensitive to either cold or heat, as every injurious influence from without is apt to concentrate in the wounds thus made.

Pliny the Elder, The Natural History, book XVII, Chapter 37. The diseases of trees.

Figure 12 Pline l'ancien décrit les risques liés à une mauvaise taille ou un labour trop près du cep dans le cadre du contrôle des maladies de la vigne d'après Bostock et al.(1855).

3.2.4 Les solutions alternatives

3.2.4.1 Le contrôle biologique

Les solutions de contrôle biologique de l'esca utilisent principalement les espèces de champignons appartenant au genre *Trichoderma* spp. (Fourie et al. 2001; Kotze et al. 2011). *T. harzianum* réduit le développement de *P. chlamydospora* dans les plaies de tailles effectuées sur cv. Cabernet Sauvignon. La colonisation de *T. harzianum* est plus importante 90 jours après inoculation lorsque celui-ci est co-inoculé avec *P. chlamydospora* (Mutawila et al. 2011b).

L'inoculation de cocktails d'agents de biocontrôle en pépinière réduit légèrement l'incidence de *P. chlamydospora*. Cependant l'application de BCA (agents de biocontrôle) pourrait être antagoniste avec l'utilisation du traitement à l'eau chaude (Fourie & Halleen 2004). L'interaction entre la plante hôte et le BCA est également importante pour favoriser la

colonisation de la plante hôte. En effet l'efficacité de *Trichoderma* spp. varie en fonction du cultivar (Mutawila et al. 2011a).

Les bactéries stimulant la croissance de la plante (Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB)) sont largement employées, certaines étant homologuées comme agents de biocontrôle ou bien candidates. Mieux connues écologiquement et moléculairement, les PGPB reflètent la complexité des interactions plante-micro-organismes (Compant et al. 2005). L'effet stimulateur de croissance provient de la compétition directe pour des niches écologiques similaires ou bien de l'induction de résistances systémiques dans la plante par la PGPB. Un travail bibliographique recense les agents de biocontrôle testés afin de lutter contre les maladies de la vigne, dont les maladies du bois (Compant et al. 2013). *Bacillus subtilis* AG1 est une bactérie candidate au contrôle des champignons associés à l'esca, cependant sa capacité de colonisation du sol et de la vigne reste à mesurer. Cet agent a été testé *in vitro* face à *P. chlamydospora* et *P. aleophilum* (Alfonzo et al. 2009). Les composés antifongiques sécrétés par *B. subtilis* AG1 et isolés lors de cette étude sont tolérants aux fortes températures (de 60 à 120°C) et à la digestion enzymatique (Alfonzo et al. 2009).

3.2.4.2 L'emploi de molécules oxydantes en agriculture, moyen de lutte de demain ?

L'ozone pourrait être une alternative pour lutter contre l'esca. L'ozone dissous dans l'eau (ou eau ozonée) est déjà utilisée en agriculture ainsi que dans les procédés agroalimentaires, notamment afin de contrôler les maladies de post-récolte (Guzel-Seydim et al. 2004; Park et al. 2008; Miller et al. 2013). Plonger du raisin de table durant 1 min dans de l'eau ozonée limite le développement de *Botrytis cinerea* (Smilanick et al. 2002). En horticulture, l'eau ozonée est employée pour nettoyer les algues et les pesticides dans les tuyaux d'irrigation. Irriguer des tomates avec de l'eau ozonée améliore leur croissance (Ohashi-Kaneko et al. 2009), la surface foliaire et l'épaisseur des tiges sans compromettre la conductivité des stomates, l'assimilation de CO_2 ou la production de fruits (Graham et al. 2011). D'autre part, la pulvérisation d'eau ozonée sur des feuilles de concombre réduit le développement de l'oïdium sans causer de phytotoxicité (Fujiwara et al. 2009). Aucun effet phytotoxique de l'utilisation d'eau ozonée sur des plantes n'a été rapporté (Fujiwara et al. 2011). L'ozone affecte les microorganismes directement ou indirectement via la formation de radicaux libres. Ces composés oxydent les lipides constituant la paroi des champignons, et pourraient également agir comme signal de mort cellulaire. L'avantage principal de l'ozone est sa faible rémanence. En effet l'ozone

dissous dans l'eau se décompose très rapidement en oxygène (Staehelln and Hoigné 1982): sa demi-vie est estimée entre 20 et 30 minutes (Khadre et al. 2001). L'ozone peut également se décomposer en radicaux libres ayant des demi-vies très courtes (Staehelln and Hoigné 1982). La diversité des composés oxydant formés expliquerait pourquoi l'ozone supprime les bactéries (Restaino et al. 1995; Young and Setlow 2004), les virus (Wedemeyer et al. 1978), et les champignons (Miller et al. 2013).

Les traitements actuellement appliqués sur la vigne sont nombreux. Développer un nouveau produit phytosanitaire contre l'esca, ayant une forte rémanence, n'est donc pas envisageable dans le contexte actuel. Développer l'utilisation de l'eau ozonée en pépinière pourrait donc être un moyen de lutte ayant un impact faible sur l'agroécosystème.

Bien que nous ayons présenté la prophylaxie, le développement de nouveaux moyens de lutte contre un pathogène nécessite d'avoir au préalable une bonne connaissance de la capacité de défense de son hôte. Or les plantes ligneuses pérennes présentent des mécanismes de défense particuliers qui pourraient être similaires chez la liane *Vitis vinifera*.

4 ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA DEFENSE DU BOIS DE LA VIGNE

4.1 PARTICULARITES ANATOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DU BOIS DES LIANES

La vigne est une liane, néanmoins cette plante ligneuse possède un tronc susceptible de mettre en place un système de défense similaire à celui employé chez les arbres. L'objectif de la vigne est d'atteindre la canopée en s'accrochant à des ligneux à port arbustif. Pour cela les *Vitaceae* disposent de vrilles s'enroulant autour d'un support par tropisme de contact. Le tronc de la vigne doit donc être résistant, flexible et permettre le transport optimal de l'eau dans les vaisseaux en évitant à tout prix la cavitation. Ainsi le tronc des lianes possède des vaisseaux plus larges en moyenne que les arbres, bien que l'importance du diamètre des vaisseaux dans les phénomènes de cavitation est sujette à débat. En effet les vignes semblent faire varier le potentiel hydrique dans leurs vaisseaux durant la nuit et suite à un épisode pluvieux, probablement afin de rétablir la colonne d'eau dans les vaisseaux souffrants d'embolies. Les lianes, et par conséquent la famille des *Vitaceae,* présentent des adaptations

fonctionnelles afin d'éviter la cavitation qui les distinguent des arbres (Putz and Mooney 1991). Le potentiel hydrique dans les racines est supérieur à celui des arbres, ce qui leur permet d'évacuer les gaz hors de vaisseaux ou hors de la plante en les dissolvants progressivement dans l'eau (Isnard and Silk 2009). L'important potentiel hydrique appliqué par les racines est également observable lors des « pleurs de la vigne ». Des trachéides non perforés assurent un flux de sève minimal lors d'embolies sévères des trachéides scalariformes principaux. Le parenchyme axial adjacent aux vaisseaux conducteurs est très développé chez les vignes. C'est un lieu de stockage d'amidon donnant également la flexibilité au tronc des lianes. Les réserves d'amidon de ce tissu sont impliquées dans la régénération des tissus blessés. Dans les boutures, les réserves d'amidons diminuent pendant 53 jours après que les racines se soient formées. La bouture débourre grâce aux réserves accumulées par la plante mère. La taille, en limitant le nombre de bourgeons, limite la déplétion des réserves du bois. Les hydrates de carbone sont fixés au niveau des feuilles et transportés vers les puits sous forme de sucrose. Les rayons des *Vitaceae* sont larges, grands et associés aux plaques du xylème. Le bois de la vigne a une surface transversale faible par rapport à la surface foliaire que le tronc doit approvisionner. Les atteintes importantes du tronc de ces espèces peuvent exacerber l'impact d'une blessure par rapport aux arbres (Putz and Mooney 1991).

La survie d'un végétal ligneux dépend principalement de sa capacité à maintenir un cambium sain (Tippett 1981). Le cambium correspond à une couche de cellules méristématiques dont les divisions engendrent le xylème secondaire et le phloème. Le cambium est en repos végétatif durant l'hiver dans les zones tempérées. Une nouvelle couche tissulaire de xylème secondaire se développe chaque année, formant un nouveau cerne. Une nouvelle couche tissulaire de phloème annuel se forme également, cependant la succession en cernes n'est pas observable. A l'inverse du xylème, la croissance du phloème est centrifuge. Le phloème le plus âgé devrait donc être en périphérie, cependant l'augmentation du diamètre du tronc le détruit. Ce phénomène participe à la formation de l'écorce (Raven et al. 2003). Le cambium est donc un tissu essentiel permettant à la plante de développer de nouveaux tissus formant le tronc chaque saison (Tippett 1981).

4.2 LE MODELE CODIT : COMPARTIMENTATION DE LA POURRITURE DANS LE TRONC.

Le modèle de compartimentation de l'infection dans le bois "CODIT" (Compartmentalization Of Decay In Tree) a été proposé durant les années 1970 par Shigo et Marx. Ce serait soit les limitations dues à la cavitation, soit la pression des pathogènes qui auraient favorisé l'apparition de ce mécanisme, probablement les deux (Smith 2006; Pearce 1996). Les arbres mettent en place de nouveaux tissus afin de cicatriser la blessure (Figure 13) et cloisonner l'infection.

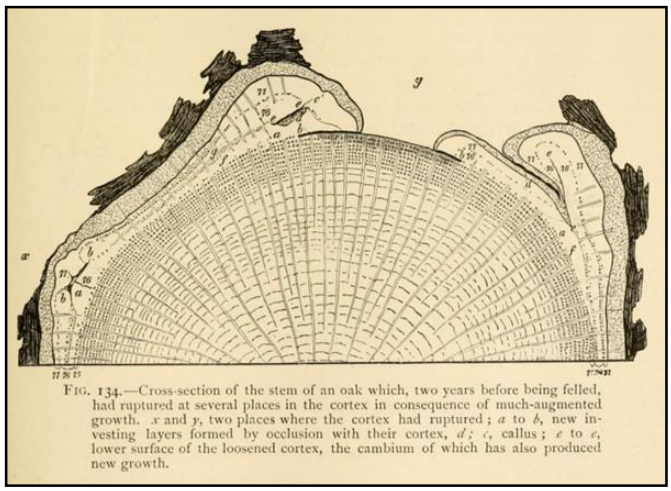


FIG. 134.—Cross-section of the stem of an oak which, two years before being felled, had ruptured at several places in the cortex in consequence of much-augmented growth. *x* and *y*, two places where the cortex had ruptured; *a* to *b*, new investing layers formed by occlusion with their cortex, *d*; *c*, callus; *e* to *e*, lower surface of the loosened cortex, the cambium of which has also produced new growth.

Figure 13 Description de la cicatrisation suite à une blessure au niveau du tronc chez les arbres. Mise en place du bourrelet cicatricielle à partir du cambium (barrière de type 4) (Hartig 1891).

Le phénomène de cicatrisation des ligneux est décrit dès la fin du XIX^{ème} siècle (Hartig 1891). La compartimentation est décrite comme la mise en place de barrières non spécifiques contre les pathogènes vasculaires. Ces barrières sont des tissus de protection mis en place en réponse à la blessure dans un premier temps, puis à l'infection. L'objectif de la mise en place de barrières est de maintenir l'infection à distance du cambium. Rapidement après sa description, le modèle CODIT a été classé dans les défenses induites non spécifiques aux pathogènes associés à l'infection. Ainsi la réponse du bois face à différents pathogènes vasculaires (*Ceratocystis ulmi* cf. *Ophiostoma ulmi*, *Verticilium albo-atrum*, *Fusarium oxysporum*) présente des caractéristiques communes : différenciation du tissu cambial en parenchyme axial, accumulation d'amidon servant d'énergie à la synthèse de polyphénols. Ce sont ces polyphénols qui permettent de distinguer de visu ces barrières de couleur brunes dans les sections de bois atteintes depuis plusieurs années. Il y aurait donc un gain de fitness pour les individus ayant acquis ce mécanisme au cours de l'évolution puisque ces barrières tiennent à distance l'infection en attendant que la croissance annuelle du xylème éloigne le

cambium. Le pathogène est confiné dans le centre du tronc. Cependant le parenchyme axial formé en réponse à la plaie n'est pas un tissu vasculaire. Par conséquent le remplacement du xylème par des zones de barrières parenchymateuses pourrait également accentuer la susceptibilité au stress hydrique chez les plantes ligneuses ayant une forte proportion de leur bois touché par l'infection (Tippett 1981).

Le modèle CODIT théorise la mise en place de barrières en deux étapes : i) la formation de trois types de barrières (types 1, 2 et 3) dans le bois présent au moment de la plaie; ii) la formation d'une barrière (type 4) par le cambium vasculaire suite à la blessure (Figure 14).

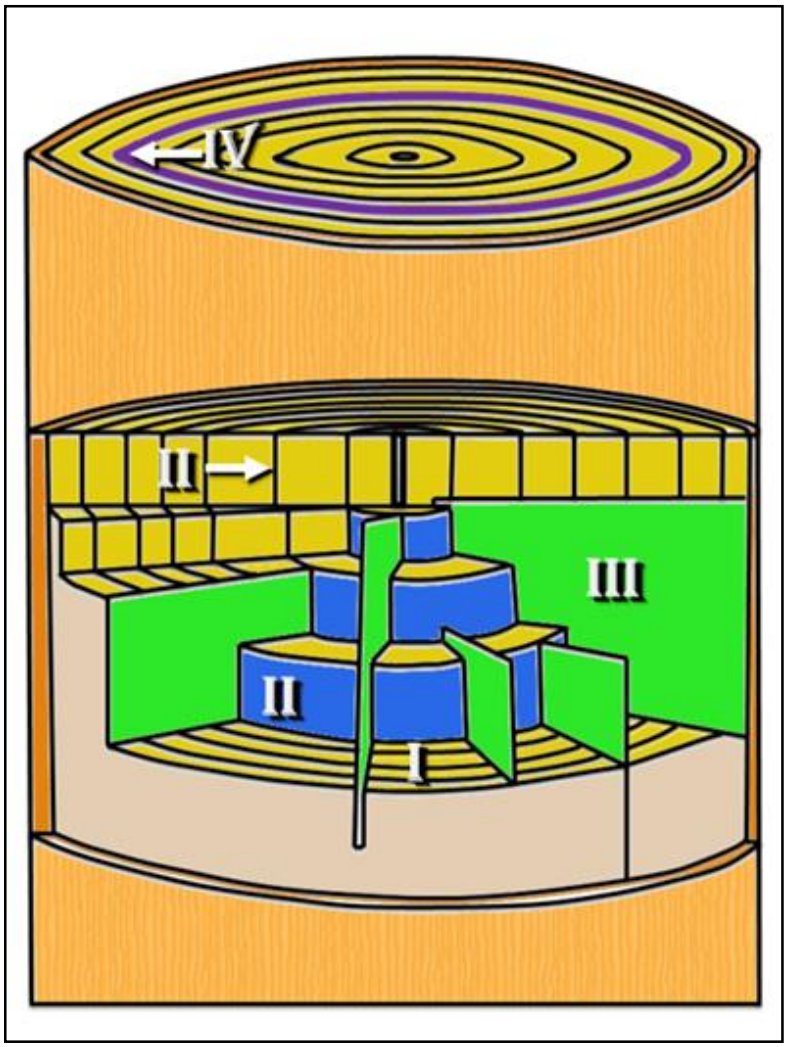


Figure 14 Le modèle CODIT théorisant la mise en place de 4 types de barrières suite à la blessure .Le Type 1 (I) compartimente les vaisseaux au-dessus et au-dessous de la plaie. Le Type 2 (II) limite la progression radiale de l'infection en formant une barrière circulaire correspondant à un cerne annuel le long de l'arbre. Le Type 3 (III) correspond à la barrière formée par les vaisseaux radiaux. Le type 4 (IV) est la seule barrière mise en place après la blessure. Le cambium vasculaire génère un parenchyme sombre permettant de repérer aisément l'année de la blessure à la noirceur importante du cerne en question. (Shigo and Marx 1977).

Concernant le bois présent au moment de la blessure, la barrière de type 1 correspond à l'occlusion des vaisseaux par des tyloses ou des calloses, de manière verticale en dessus et en deçà de la zone touchée. La contrainte de cette isolation verticale pour le pathogène et faible mais rapidement mise en place par la plante. La barrière de type 2 est continue autour de l'anneau de croissance annuel sur toute la longueur de l'arbre. La barrière de type 3 est diffuse puisqu'elle se met en place dans les rayons radiaux et longitudinaux qui ne sont pas continus. Les zones délimitées par la barrière 1,2 et 3 sont également nommées zones de réactions. Les échanges chimiques dans les zones de réactions sont importants et conduisent à l'accumulation de subérine, d'eau, de composés antifongiques ou de polyphénols.

Enfin la barrière de type 4 correspond à une barrière de type 2 localisée. La différenciation du cambium vasculaire en parenchyme formant la barrière de type 4 dépends de la taille de la blessure, de son type et de la saison où cette blessure à lieu (Shigo and Marx 1977; Pearce 1996). Le tissu formé apparait également dans la littérature sous le nom de périderme nécrophylactique (Robinson et al. 2004). La régulation intervenant lors de la mise en place de la barrière de type 4 semble être beaucoup plus importante que pour les trois autres types.

L'observation macroscopique du phénomène de compartimentation de l'infection est décrite comme aspécifique aux pathogènes envahissant les plaies (Blanchette and Biggs 1992). Cependant l'évolution des défenses induites chez les plantes génère des interactions spécifiques entre plantes et ravageurs (Karban and Baldwin 1997). Par conséquent la description générale de la mise en place de la compartimentation par le modèle CODIT pourrait intégrer un certain niveau de spécificité. La présence d'un pathogène dans la plaie retarde la mise en place du périderme nécrophylactique et réduit l'intensité de la subérisation des tissus chez les gymnospermes (Wahlström and Johansson 1992; Solla et al. 2002; Cleary et al. 2012). Clarifier le niveau de spécificité de la réponse du bois face à l'infection parait essentiel afin de comprendre le rôle de chaque agent impliqué dans les pathosystèmes complexes tels que l'esca (Bertsch et al. 2013). La réponse de la plaie infectée par *P. chlamydospora* ou *P. aleophilum* est différente en histologie (Pouzoulet et al. 2013; Pouzoulet 2012). La spécificité de la réponse du bois peut-être décryptée en étudiant les mécanismes de la réponse de ce tissu. Cependant les mécanismes de défense du bois de la vigne sont très peu documentés. Toutefois, grâce à d'autres modèles, la défense chez les végétaux et bien mieux connue et pourrait être appliquées à l'étude des maladies du bois de la vigne.

4.3 LES GRANDS TYPES DE DEFENSES CHEZ LES PLANTES

Il existe deux grands types de défenses chez les végétaux. Les défenses basales sont exprimées de manière constitutive par la plante sans nécessiter de stress biotiques ou abiotiques. Les défenses basales immunisent contre un large spectre de pathogènes et peuvent également intervenir dans d'autres voies métaboliques associées à la croissance ou la floraison (résistance non-hôte (Figure 15)). Les phytoanticipines telles que les composés phénoliques présents dans le bois sain, l'acide gallique, les catéchines ou salicines présentent dans l'écorce, inhibent la croissance de champignons phytopathogènes sur boite à des doses supérieures à celle mesurées *in situ*. Les phytoanticipines pourraient donc agir en synergie contre les ravageurs (Pearce 1996). Cependant les défenses constitutives ne doivent pas être perçues comme fixes et constantes puisqu'elles varient considérablement entre les individus et en fonction du stade phénologique de la plante. Ainsi les polyphénols varient quantitativement et qualitativement dans les feuilles de *Vitis vinifera* selon leur position sur le sarment et l'âge de la plante (Schoedl et al. 2012).

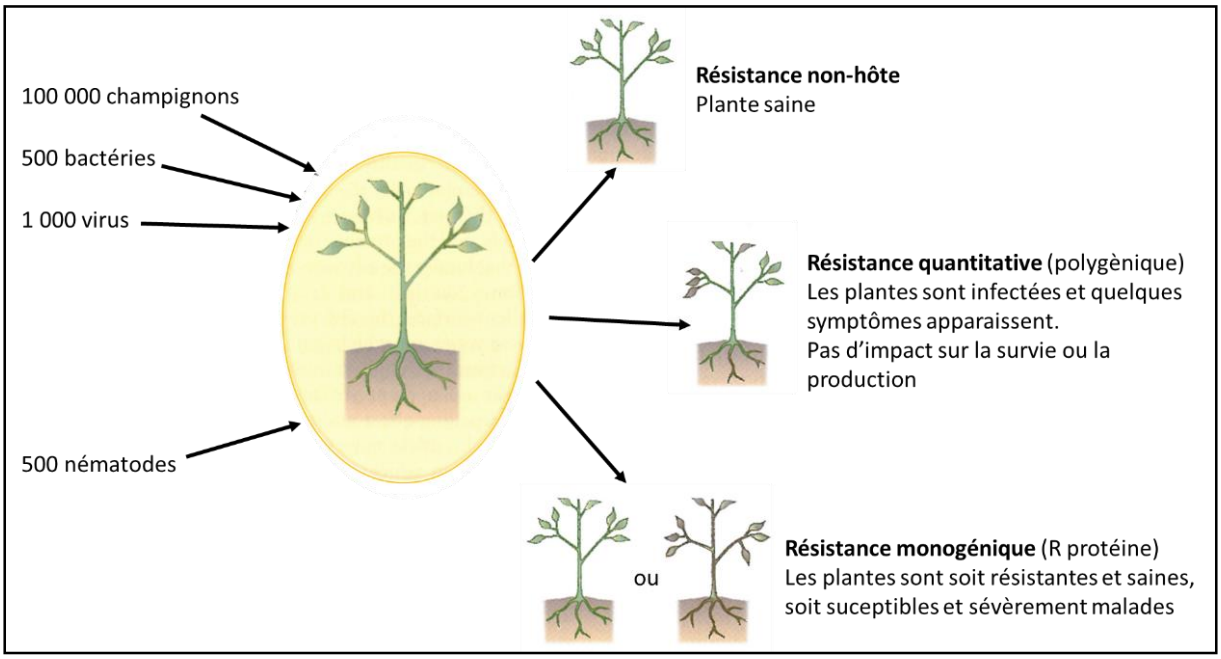


Figure 15 Les réactions de la plante en réponse au panel de ravageurs potentiels, d'après Agrios (2005).

Les défenses constitutives incluent la morphologie. Ainsi les champignons causant des pourritures du tronc imposent une pression de sélection sur la taille et la position des vaisseaux dans le tronc. Certaines espèces espacent les vaisseaux dans le xylème des plus jeunes tiges. Les composés associés aux défenses constitutives peuvent également être

induits dans des quantités plus importantes suite à la perception d'un stress. L'écorce est la première ligne de défense car elle protège le cambium et le xylème (Blanchette and Biggs 1992). Les pathogènes observés sur la vigne auraient la capacité de stocker, éviter ou détoxifier ces défenses constitutives (Schoonhoven et al. 2005; Karban and Baldwin 1997). Chez les plantes ligneuses, les phytopathogènes colonisant le xylème envahissent ce tissu par des entrées naturelles (plaies mécaniques, herbivorisme, remplacement des feuilles), des plaies de tailles associées à l'itinéraire technique de la culture, ou finalement en passant l'écorce (Shigo & Marx 1977; Pearce 1996). Il ne faut pas négliger les défenses constitutives lors de l'étude des pathosystèmes car celles-ci pourraient expliquer les différences de tolérance de la vigne face à l'esca (Lima et al. 2012). Cependant ces défenses sont insuffisantes pour contrer la progression des champignons associés à la maladie.

Certains pathogènes sont capables de s'accommoder des défenses constitutives. En réponse, les plantes ont développé les défenses induites : émission de composés organiques volatiles, synthèse de composés fongicides tels que les stilbènes, des composés phénoliques et des tannins. La synthèse de ces composés impose d'allouer à la défense une part conséquente d'énergie qui devait servir à la croissance et la reproduction de l'individu. Ce conflit d'intérêt et l'imprévisibilité des attaques de pathogènes expliquent l'apparition de ces défenses induites. La mise en place de ce type de défense sous-entend un système de perception subtil et spécifique de l'environnement par la plante (résistances quantitative et monogénique (Figure 15)) ainsi qu'une régulation complexe de l'expression des traits de défenses (Karban & Baldwin 1997).

Les mécanismes responsables de la spécificité de la perception des pathogènes sont présentés suivant les évènements chronologiques de la reconnaissance, de la transduction du signal et enfin des réponses de la plante. Ces connaissances générales de la physiologie de la défense végétale sont illustrées chez la vigne lorsque celles-ci ont été documentées.

4.4 L'INDUCTION DES DEFENSES CHEZ *VITIS VINIFERA* L.

4.4.1 La reconnaissance

4.4.1.1 Le modèle gène pour gène

Il existe des subdivisions au niveau des espèces. Les espèces de plantes se subdivisent en variétés, tandis que les espèces de pathogènes se divisent en souches. Or seulement certaines souches de pathogènes infectent seulement certaines variétés de l'espèce végétale hôte. Flor développa le modèle gène pour gène (Figure 16 a) : l'observation de ces résistances différentielles nécessitent l'interaction des produits de deux gènes (Flor 1956). Dans le cadre d'une interaction incompatible (*i.e.* résistance de la plante), le gène de résistance fonctionnel R code un récepteur qui interagit avec le produit du gène fongique d'avirulence fonctionnel associé (AVR). Ces récepteurs sont le plus souvent des protéines localisées au niveau de la membrane des cellules végétales (Figure 16 b), les récepteurs plus connus étant des protéines transmembranaires (Lepoivre 2003).

Le séquençage du génome de la vigne a permis de prédire de nombreux gènes R : 233 gènes codant des protéines contenant des domaines NBS et LRR, 53 RLKs dont 8 proches de la Pto cytosolique chez la tomate. Deux gènes codant des protéines de classe 1 impliquées dans la résistance contre *Plasmopara* ont été identifiés. Comme dans de nombreux modèles, les gènes R découverts lors de l'étude de différents pathosystèmes sont regroupés en cluster dans le génome de la vigne. Cette disposition physique sur le chromosome permet de générer de la variabilité génique par recombinaison plus rapidement, et favorise donc l'agrandissement de cette famille de gènes (Gomès 2009). Les gènes *MrRUN1* et *MrRPV1* appartiennent à un cluster sur le gène 12 de *V. rotundifolia* contenant sept gènes TIR-NB-LRR. Les plantes exprimant ces gènes sont résistantes à plusieurs souches de mildiou de la vigne et d'oïdium (Feechan et al. 2013).

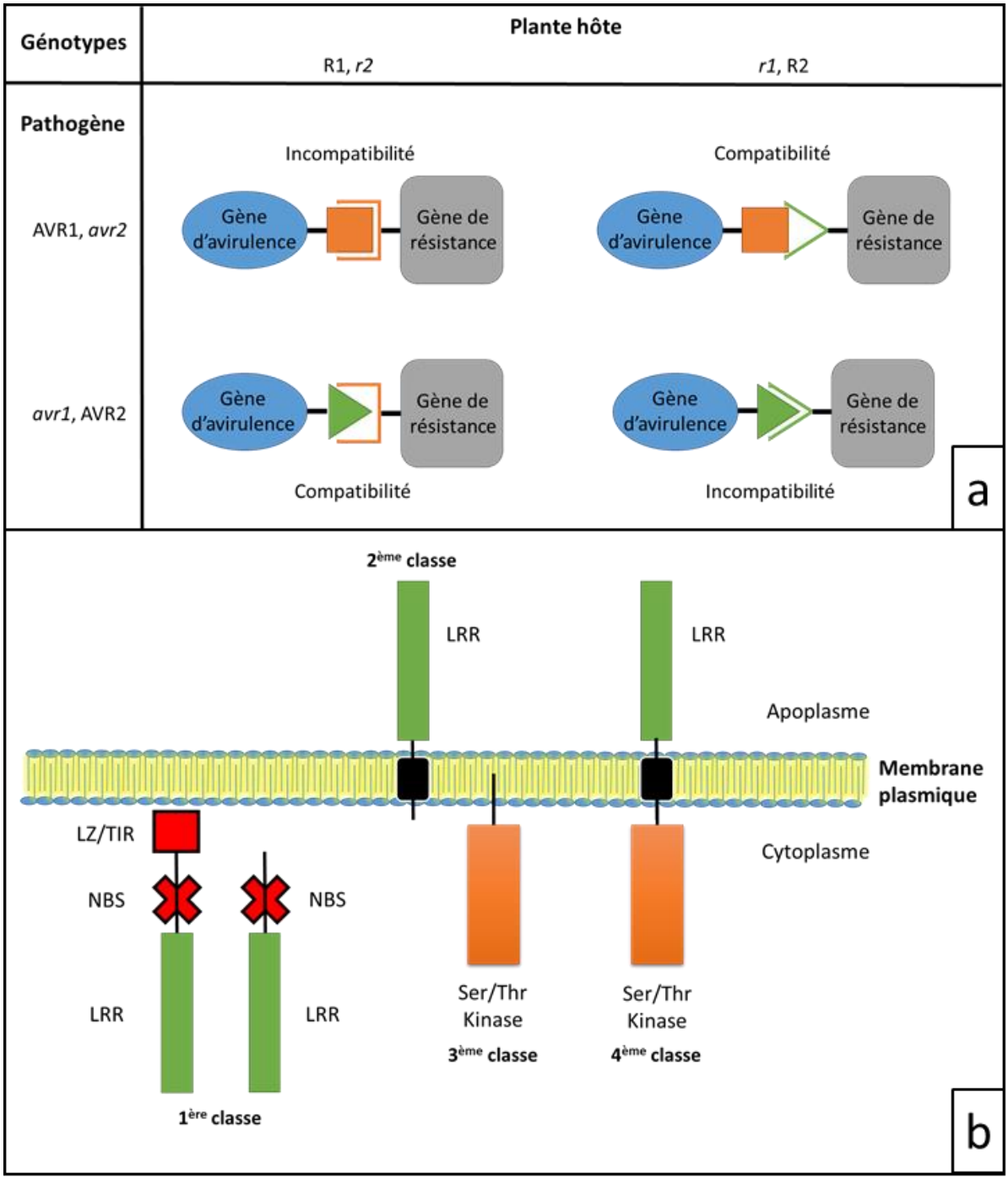


Figure 16 La spécificité immunitaire chez les plantes : a) le modèle gène pour gène : dans le cas d'une interaction incompatible (résistance de la plante), un allèle de virulence fonctionnel (AVR) code une protéine fongique perçue par un récepteur végétale spécifique, codé par un allèle de résistance fonctionnel (R). Les allèles avr et r sont non fonctionnels. b) les différentes classes de récepteurs membranaires codés par les gènes de résistance ainsi que les différents domaines les constituants. LRR : Leucin-Rich repeats ; Ser/Thr Kinase : Sérine/Thréonine Kinase ; NBS : Nucleotide Binding Site ; LZ : Leucin Zipper ; TIR : Toll Interleukin Receptor. D'après Lepoivre (2003).

4.4.1.2 Les éliciteurs de la défense végétale

L'étude des mécanismes impliqués dans l'immunité innée spécifique chez les plantes a permis la mise en évidence des éliciteurs, *i.e.* des molécules produites par le pathogène et

responsables de l'induction de défense chez la plante hôte (Agrios 2005). Cependant la présence de ces composés ne permet pas d'expliquer à elle seule la spécificité observée dans le cadre du modèle gène pour gène. Les éliciteurs induisent une défense végétale de faible amplitude qui est impliquée dans les réactions de défense non-hôte (Figure 15 p72). En réalité, la famille des éliciteurs n'est pas restreinte aux composés issus d'organismes pathogènes, mais comporte différentes catégories.

Les éliciteurs abiotiques tels que les rayons ultraviolets (Tang et al. 2011), l'ozone atmosphérique (Sandermann et al. 1998; Grimmig et al. 2002) ou des métaux lourds entrainent l'induction de phytoalexines. Les parois cellulaires fongiques et bactériennes sont majoritairement constituées de β-glucane, un éliciteur biotique saccharidique. Chez la vigne les β-1,4-cellodextrines (Aziz et al. 2007; Zamboni et al. 2009) et la laminarine (Aziz et al. 2003; Gauthier et al. 2014) sont des éliciteurs. Les chitines (oligomères d'acétylglucosamine), et le chitosan (polymères de glucosamine) appartiennent également à cette catégorie (Rabea et al. 2003). Les glycoprotéines arborent la surface de cellules eucaryotes et leur partie glucidique agirait comme éliciteurs. Il existe également des éliciteurs de nature protéique, les élicitines, dont le poids moléculaire avoisine 10 kDa. Une endo-polygalacturonase (Poinssot et al. 2003) et l'oligandrine (Mohamed et al. 2007) élicitent les défenses chez *Vitis vinifera*. Enfin des éliciteurs de nature lipidique (phospholipide, triglycérides, lipoglycoprotéines, acides gras insaturés) induisent les défenses mais de manières plus variables que les éliciteurs précédemment listés en fonction des espèces végétales. Le principal éliciteur lipidique décrit chez la vigne est l'ergostérol. De manière générale, les éliciteurs sont des composés essentiels et constitutifs des microorganismes capables d'être perçus par la plante. Pour cela ils portent également le nom de PAMPs ou MAMPs pour Pathogen/Microbe Associated Molecular Patterns (Gomès 2009; Lepoivre 2003; Agrios 2005).

La paroi de la cellule végétale est également composée d'oligosaccharides qui sont hydrolysés lors des interactions plantes-pathogènes. Certains composés issus de cette dégradation sont perçus par la plante et associés à une attaque. Il existe donc des éliciteurs endogènes, également nommés DAMPs pour Damage Associated Molecular Patterns. Les cellules végétales sont capables de percevoir les PAMPs et les DAMPs grâce à des récepteurs tels que la FLS2. La FLS2 est un récepteur percevant la flagelline Flg22 du flagelle des bactéries. Tout d'abord décrit chez *Arabidopsis* (Zipfel et al. 2004), le récepteur FLS2 existe également chez la

vigne (Trdá et al. 2014). Les différents récepteurs de PAMPs connus à ce jour (*i.e.* FLS2, EFR, CERK1, CEBiP) sont regroupés dans la famille des PRRs (Pattern-Recognition Receptors) (Zipfel and Robatzek 2010). La perception d'un organisme étranger par la cellule végétale, qu'elle soit spécifique via un récepteur codé par un gène R ou non spécifique via un récepteur type PRR, doit être signalée au noyau. Il serait bien sûr intéressant de comprendre la signalisation de la réponse du bois de la vigne afin de développer des Stimulateurs de Défense Naturelle.

4.4.2 La signalisation

La reconnaissance d'un motif associé à un pathogène au niveau de la membrane de la cellule végétale déclenche une cascade de signaux cellulaires à destination du noyau, siège de l'information génétique. Des flux de Ca^{2+}, la synthèse d'espèces d'oxygène réactives (ROS) et des MAP Kinases sont impliqués dans la transmission de ce signal (Gomès 2009).

4.4.2.1 La signature Ca^{2+} et son décodage

Les variations des motifs de flux Ca^{2+} cytosoliques forment une signature participant à la spécificité de la reconnaissance hôte-pathogène (Lecourieux et al. 2006). Il existerait donc une machinerie cellulaire, organisée en cassette, capable d'intégrer la perception de stimuli en une réponse physiologique sensée (Ng and McAinsh 2003). Deux types de senseurs, capables de lier le Ca^{2+}, participent au décodage de la signature Ca^{2+} : i) les senseurs-relais et les ii) senseurs-effecteurs. Les senseurs-relais (i), tels que les calmodulines (CAM), ont une activité bimoléculaire. Suite au changement de conformation résultant de leur liaison avec le Ca^{2+}, les CAM se lient à leur protéine cible et modifient leur activité ou leur structure. Les senseurs-effecteurs (ii) sont des protéines dont la conformation ou l'activité propre sont modifiées suite à leur liaison avec le Ca^{2+} (Sanders et al. 1999; Lecourieux et al. 2006). Les variations de Ca^{2+} dépendent de dérivés réactifs de l'oxygène (Lecourieux et al. 2006).

4.4.2.2 La participation des ROS à la signalisation

Extrêmement réactives et toxiques, les ROS étaient la contrepartie du mode de vie aérobie avant de participer à la régulation de métabolisme de la plante, dont la régulation des défenses. Au moins 152 gènes sont impliqués dans la régulation des ROS chez *Arabidopsis thaliana* (Mittler et al. 2004). Les ROS sont produits intensément durant le premières étapes de la signalisation du stress (Garcia-Brugger et al. 2006). Lorsque des cultures cellulaires de *Vitis vinifera* L. sont inoculées avec de la biomasse de *P. chlamydospora* autoclavée, la

production de ROS est détectable 1 hpi et ce jusqu'à 5 hpi (Lima et al. 2012). Cette étude suggère la mise en place d'une réponse précoce des cellules de la vigne face à ce pathogène du bois ou bien l'une de ses toxines présentent dans le milieu.

Différentes enzymes répondent au stress oxydatif, qu'il soit généré par la plante elle-même (ROS) ou bien environnemental (ozone). Les Glutathion S-transferases (GSTs) sont des enzymes impliquées dans la détoxication des herbicides et plus généralement dans la réponse aux stress (biotiques, oxydatif, toxicité due aux métaux lourds) (Marrs 1996). Quelle que soit leur fonction, les GSTs conjuguent le Glutathion S réduit à leur cible et permettent le transport de celles-ci (Marrs 1996). Les superoxide dismutases (SODs) sont également exprimées lors de stress oxydatifs chez les végétaux (Alscher 2002). L'induction des gènes *GSTs* et *SODs* peut renseigner du niveau de stress oxydatif de la cellule végétale (Alscher 2002; Sheehan et al. 2001)

4.4.3 Les réponses

4.4.3.1 Les hormones de la défense

Lorsque le signal est transmis au noyau, des gènes de défense vont être transcrits en ARNm afin d'être traduits en protéines de défense. A chacune de ces étapes une régulation complexe et peu comprise intervient, permettant à la plante d'exprimer une réponse subtilement adaptée au contexte biotique et abiotique en place au moment de l'attaque.

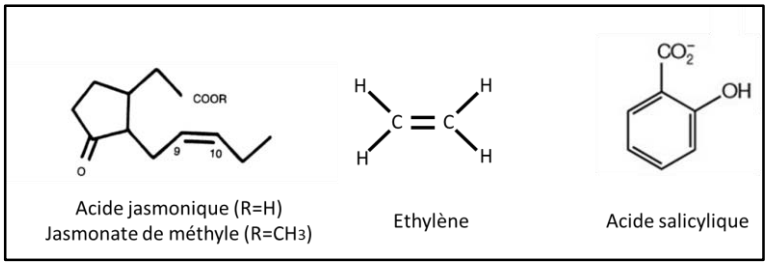


Figure 17 Les trois grandes hormones de la défense végétale (d'après Gundlach et al. 1992; Wildermuth et al. 2001).

En sortie de signalisation, trois hormones végétales sont impliquées dans l'induction des gènes de défenses (Figure 17) : l'acide jasmonique (JA) (Belhadj et al. 2006; D'Onofrio et al. 2009; Repka et al. 2004), l'acide salicylique (SA) (Chen et al. 2006; Derckel et al. 1998; Zhang et al. 1999) et l'éthylène (Et) (Grimmig et al. 2002; Sun et al. 2007; Chong et al. 2009).

Chez *Arabidopsis*, les pathogènes nécrotrophes induiraient la voie de JA-Et, tandis que les biotrophes induiraient la voie de SA (Thomma et al. 2001). Chez la vigne certains gènes sont marqueurs de ces voies hormonales, cependant celles-ci s'entrecroisent et sont à ce jour mal définies (Gomès 2009; Chong et al. 2008). Pour exemple, les gènes *VpSBP5* (Squamosa Promoter Binding Protein, Hou et al. 2013), *PAL*, *STS* (Chong et al. 2008) répondent aussi bien à l'acide salicylique qu'à l'acide jasmonique chez la vigne.

4.4.3.2 Les phytoalexines et les protéines « PR »

Peu d'études s'intéressent aux interactions vigne-microbe dans le contexte de l'esca. Etudier l'expression des gènes de défense dans le bois de la vigne, notamment l'extraction d'ARN, est difficile mais faisable (Bordiec et al. 2010). La technique de Reverse Transcription-qPCR (RT-qPCR) permet de mesurer le facteur d'induction relatif d'un gène par rapport à un gène de ménage et à un traitement (Livak and Schmittgen 2001). Néanmoins, l'orchestration des défenses chez les végétaux est très bien décrite dans d'autres systèmes et permet d'envisager la même forme de régulation des gènes de défense dans le bois de *Vitis vinifera* L. Les travaux préliminaires sur la compréhension de la régulation des défenses dans le bois nécessitent de cibler des gènes participant à différentes fonctions dans la réponse de la plante. Cette section s'attachera donc à présenter des gènes impliqués dans la défense chez les végétaux et ayant été étudiés chez la vigne (le plus souvent dans les tissus foliaires).

Dans de nombreux cas l'entrée d'un pathogène résulte d'une blessure. La réponse du tronc à la blessure est observable 24 h après traitement en microscopie optique. Dans les 24 h suivantes, les noyaux en prophase des cellules sont proéminant. Ensuite des dépôts de polysaccharides au niveau de la paroi cellulaire sont visibles jusqu'à 300 µm au-dessus de la zone blessée. La lignification des tissus proches du cambium et entourant la plaie est observée 72 h après traitement. Ses modifications sous entendent la synthèse de protéines *de novo* et par conséquent l'expression de gènes dans le bois (Blanchette and Biggs 1992), cependant ce phénomène n'est pas documenté chez la vigne.

De nombreuses molécules issues de la voie des phénylpropanoïdes présentent des propriétés antifongiques. La phénylalanine ammonia-lyase (PAL) est l'enzyme clée de cette voie associé à l'acide salicylique. L'activité de l'enzyme PAL augmente lorsque les conditions de lumière varient, après une incision ou suite à l'attaque d'un pathogène. Cette activité dépend également de l'éthylène (Jones 1984). D'autres enzymes sont également exprimées

précocement dans cette voie métabolique, notamment la cinnamate-4-hydroxylase (C4H) et la 4-coumarate CoA ligase (4CL). Le génome de la vigne possède 13 gènes codant des PALs (Chong et al. 2009). L'induction de *PAL* est plus précoce dans les cultures cellulaires inoculées avec *P. chlamydospora* (12h) que *P. aleophilum* (24h) et revient à un niveau basal 72 h après traitement (Luini et al. 2010).

L'enzyme PAL est aussi impliquée dans la voie de biosynthèse des lignines (Jones 1984), mais également des stilbènes. Ces molécules découlent de l'activité des stilbènes synthases (20-40 STS gènes chez *V. vinifera* L.) et sont caractérisées par une base 1,2-diphenyléthylene (Figure 18). Ces enzymes sont induites par un éventail de stress biotiques et abiotiques (Chong et al. 2009; Belhadj et al. 2008; Dai et al. 2012). La concentration en resvératrols dans des calles inoculés avec *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* est supérieure en comparaison au témoin non inoculé. Toutefois ces deux champignons sont capables de les métaboliser (Bruno and Sparapano 2006). Les stilbènes, tels que les resveratrols ou les viniférines, inhibent la germination des conidies, le développement du mycélium ainsi que la pénétration des champignons dans les cellules de la vigne (Chong et al. 2009). Les stilbènes sont induits lorsque des feuilles de vigne sont aspergées avec de l'acide jasmonique ou bien lorsque les feuilles sont inoculées avec un champignon nécrotrophe (Chong et al. 2009, 2008). Suite au traitement de cultures de cellules de vigne avec de l'acide jasmonique, les gènes codant la PAL et la STS sont induits (Belhadj et al. 2008).

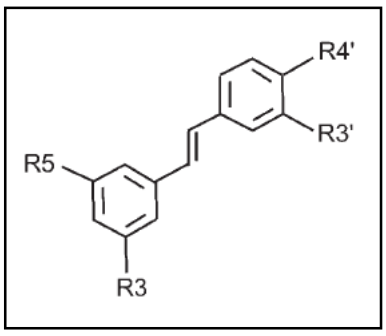


Figure 18 La base 1,2-Diphenyléthylène des stilbènes (Chong et al. 2009).

Les traitements à l'acide jasmonique induisent des gènes codant les lypoxygènases (LOX, Turner et al. 2002). Les LOX sont des enzymes participant à la voie de biosynthèse d'oxylipines, dont l'acide jasmonique. Ces enzymes régulent la maturation du pollen et la réponse à la blessure chez *Arabidopsis* et sont également impliquées dans la réponse aux éliciteurs (Turner et al. 2002). Des feuilles de vignes inoculées avec *Botrytis cinerea* (champignon nécrotrophe),

Plasmopara viticola (oomycète biotrophe) et *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* répondent différemment suivant l'identité du pathogène inoculé, dans les heures suivant le traitement (Chong et al. 2008). Ces trois pathogènes induisent fortement les gènes *STS*, *PAL*, and *HSR1*. Dans cette étude Chong et al. (2008) montrent, sur un modèle d'inoculation foliaire, la spécificité des interactions vigne-microbe. *VvNHL1* et *VvEDS1* chez *V. vinifera* L. dont les hortologues identifiés chez *Arabidopsis* (respectivement *ndr1* and *eds1*) sont impliqués dans la régulation des défenses. L'expression de ces gènes dans des feuilles détachées de cv. Chardonnay est différente suivant qu'elles reçoivent un traitement SA, JA, *Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola* ou *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. Les plantes traitées avec de l'acide jasmonique induisent les gènes *Chit1b*, *HSR1* et *PR3*. Ces gènes peuvent être associés à la voie de l'acide jasmonique chez *V. vinifera* (Chong et al. 2008).

Des vignes dessouchées cv. Chardonnay/41B âgées de 26 ans ont été classées en trois groupes, suivant l'expression des symptômes d'esca de leur rameaux: rameaux apoplectiques, rameaux présentant la GLSD, rameaux asymptomatiques sur une plante exprimant l'esca, rameaux asymptomatiques sur une plante n'exprimant pas l'esca. L'étude de l'expression des gènes de défense entre ces différentes catégories de rameaux révèle que le gène codant la thaumatin-like (PR5) est plus exprimé dans les rameaux dont les feuilles présentent la GLSD (Spagnolo, et al. 2011). Les glucanases semblent agir en synergie avec les protéines thaumatin-like pouvant se fixer aux β-1,3-glucanases (Basha et al. 2010). D'autre part, l'induction des gènes codant les chitinases et les thaumatin-like est associée à un taux élevé de resvératrol chez la vigne (Chong et al. 2009).

Enfin, il existe des protéines PR dont la fonction est mal connue mais dont les gènes sont induits par certains pathogènes. C'est le cas chez la vigne des *PR10a* (Figueiredo et al. 2012) et *PR10.3* (Castro et al. 2008) qui coderaient des ribonucléases (Van Loon and Van Strien 1999) associées à la réponse contre les virus chez les végétaux.

4.4.3.3 Les effecteurs et le modèle en Zigzag

La perception précoce des phytopathogènes serait aspécifique (Blanchette and Biggs 1992). Les végétaux supérieurs ont développé des récepteurs percevant des molécules communes à de nombreux micro-organismes, nommées PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns).

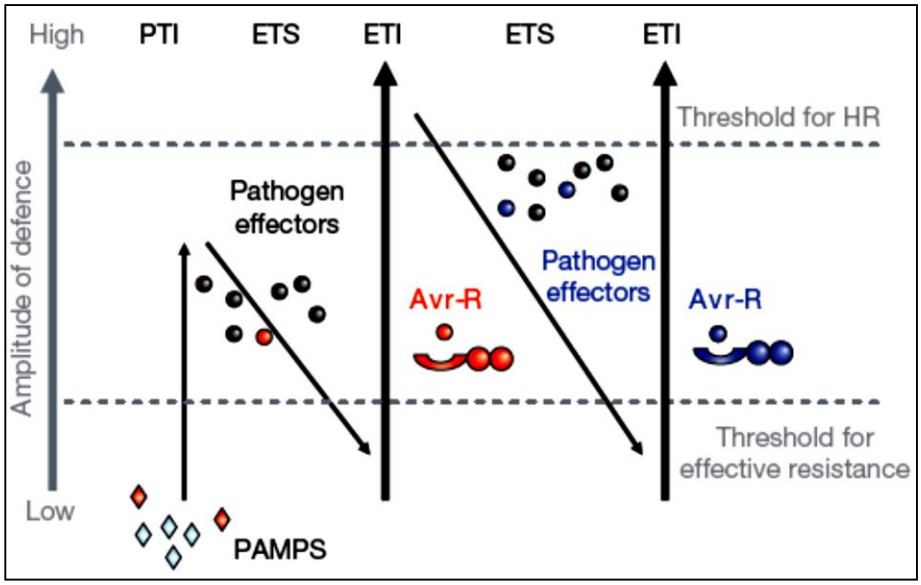


Figure 19 Le modèle en Zigzag (Dangl et Jones 2001).

La perception de la flagelline ou bien de la chitine renseigne de la présence de microbes ou d'insectes et induit une défense d'intensité moyenne chez la plante hôte (PAMP-Triggered Immunity (PTI)). Certains organismes contournent la PTI et diminuent la fitness de la plante en sécrétant des effecteurs essentiels à leur virulence (avr). Les plantes ayant exprimé des récepteurs spécifiques (R-gènes) à ces effecteurs (Avr) possèdent un avantage évolutif d'autant plus considérable que l'induction des défenses résultant de la perception des effecteurs fongiques (Effector-Triggered Immunity (ETI)) est forte. La plus illustrative de ces inductions est la réponse hypersensible. Le modèle en Zigzag (Dangl et Jones 2001) théorise la course à l'armement entre la perception de la plante et la variété des effecteurs sécrétés par les micro-organismes (Figure 19).

La réaction locale de la plante peut également entrainer une réaction systémique dans les tissus éloignés de la zone blessée ou infectée (Figure 20). Il s'agit de la résistance systémique acquise (SAR).

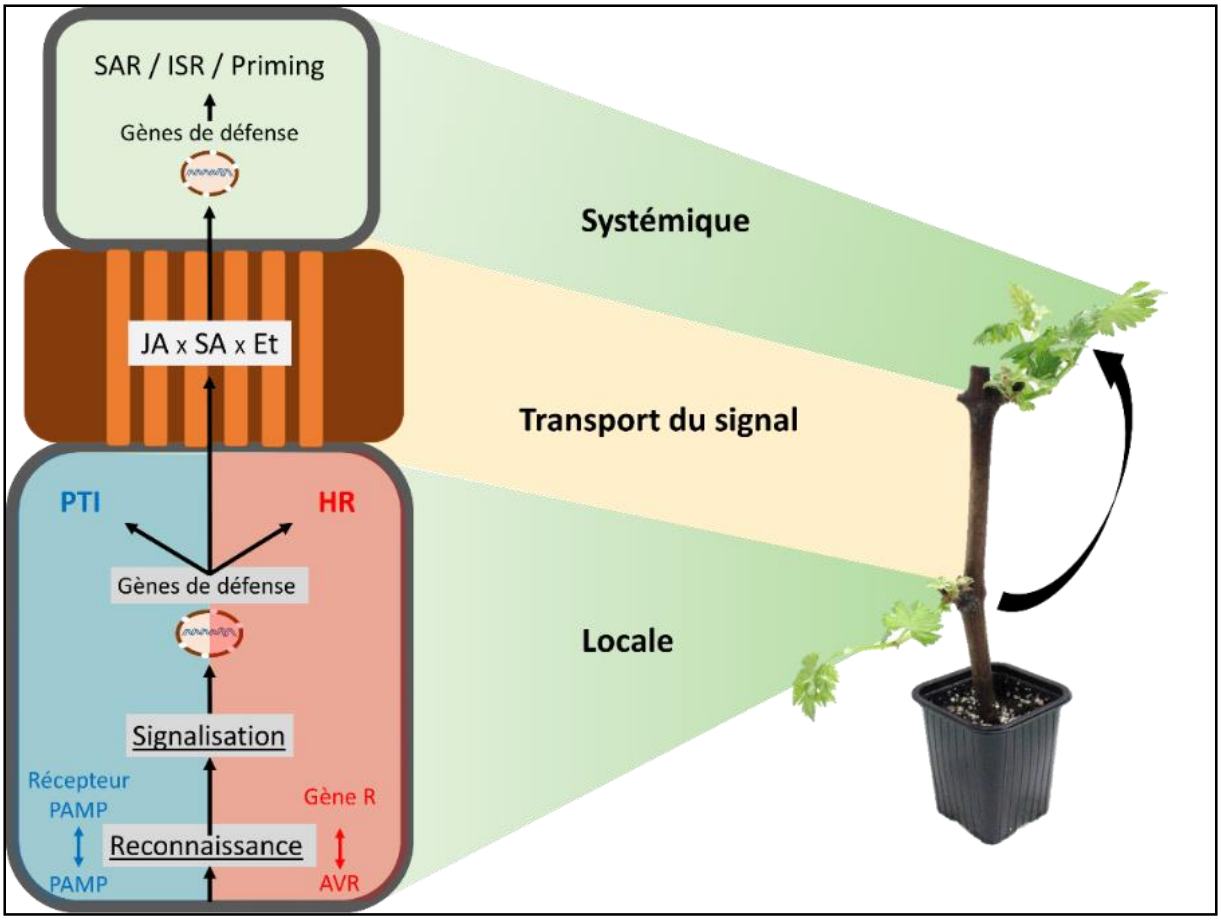


Figure 20 Schéma général de la réponse de la vigne aux stress biotiques. PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern ; AVR : allèle d'avirulence fonctionnel ; PTI : PAMP Triggered Immunity ; HR : Réponse Hypersensible ; JA : Acide Jasmonique ; SA : Acide Salicylique ; Et : Ethylène ; SAR : Systemic Acquired Resistance ; ISR : Induced Systemic Resistance.

Les organismes auxiliaires tels que les bactéries non pathogènes stimulatrices de la croissance végétale induisent également une réaction dans les organes éloignés du site de colonisation : la résistance systémique induite (ISR). Le phénomène physiologique de priming ou potentialisation des défenses est commun à la SAR et l'ISR. Dans le cas du priming, les défenses de la plante ayant reçu un traitement potentialisant la réponse sont exprimées plus rapidement et plus intensément suite à la perception du pathogène. La Figure 20 schématise les différentes étapes de la mise en place des défenses chez les végétaux.

4.4.3.4 La réponse du métabolisme primaire

Les sucres sont les molécules les plus importantes chez les plantes car ils participent à la synthèse de composés nutritifs, mais aussi de métabolites participant à la régulation osmotique et à la signalisation cellulaire (Afoufa-Bastien et al. 2010). L'impact de la réponse de la plante, donc de l'activité du métabolisme secondaire, sur le métabolisme primaire est

rarement investigué. Lors des interactions compatibles plante-pathogènes, l'activité photosynthétique diminue tandis que la demande en photoassimilats au niveau des feuilles augmente. L'activité des invertases pariétales marque le changement de statut de source à celui de puit chez les organes infectés (Berger et al. 2007). Les gènes *Cell Wall invertases* (*CWinv*) codent des enzymes extracellulaires catalysant l'hydrolyse des sucres apoplastiques (Sherson et al. 2003) dont l'expression varie suivant les stress biotiques et abiotiques (Roitsch et al. 2003). Ces enzymes régulent la libération des sucres du phloème à proximité des organes puits (Hayes et al. 2007). Chez Arabidopsis, *Atβfruct1* est induit durant les 6 jours suivant l'infection de feuilles par *Erysiphe cichoracearum* (Fotopoulos et al. 2003). Chez la vigne le gène *VvCWinv* participerait à la transition de statut source à celui de puit chez les organes infectés par des biotrophes (Hayes et al. 2010). L'étude de l'expression du gène *CWinv* de la vigne (Polesani et al. 2010) permettrait d'appréhender l'impact de la réponse de la plante sur le métabolisme primaire et de repérer la force de l'organe puit ou de l'organe source étudié.

5 OBJECTIFS ET STRATEGIE

5.1 SYNTHESE DU CONTEXTE

Le pathosystème esca est de toute évidence complexe (Bertsch et al. 2013). Le terme esca engloberait différents symptômes au niveau du tronc (young esca, esca proper), ainsi que des feuilles (Grapevine Leaf Striped Disease, BDA et apolexie) (Mugnai et al. 1999; Larignon et al. 2009; Lecomte et al. 2012; Bertsch et al. 2013). D'autre part une multitude de microorganismes est associée à l'expression de ces différents symptômes dont l'apparition dépend de facteurs environnementaux restant à caractériser (Guerin-Dubrana et al. 2013; Bruez et al. 2014). Parmi la multitude d'organismes isolés dans le bois de ceps exprimant l'esca, la communauté scientifique travaillant sur les maladies du bois s'accorde sur le fait que les *Phaeoacremonium, Phaeomoniella chlamydospora*, *Eutypa lata*, *Fomitiporia mediterranea* font partie des pionniers (Mugnai et al. 1999; Bertsch et al. 2013).

La porte d'entrée de ces pathogènes dans la plante n'est pas avérée. L'infection via les plaies de tailles est probable compte tenu des nombreuses opérations de taille effectuées au vignoble. D'autre part les inoculations de pathogènes dans des blessures causent des

symptômes d'altération du bois. La période de latence est longue puisque les ceps infectés expriment les symptômes foliaires lorsqu'ils sont âgés de 10 à 30 ans. Des travaux ont été menés sur l'apparition des symptômes foliaires au vignoble, apportant des connaissances précieuses sur les pathogènes impliqués, les toxines sécrétées et la réponse de la plante. Nul doute que ces travaux apporteront des solutions pour atténuer ou éviter l'expression des symptômes foliaires d'esca. Cependant lorsque les symptômes apparaissent, la dégradation des tissus du tronc est déjà avancée. Limiter la colonisation du bois demande de connaitre comment les champignons envahissent les tissus du bois et comment la plante répond à cette attaque dans les premières semaines de ce pathosystème complexe. La compréhension des évènements précoces des interactions vigne-microbes dans le bois permettrait de développer des moyens de lutte supplémentaires. Aucun moyen de lutte efficace contre l'esca n'est disponible à ce jour. D'autre part, la viticulture fait partie des productions utilisant le plus de produits phytosanitaires. Il est donc important de développer des moyens de lutte contre l'esca pour une viticulture durable.

5.2 OBJECTIFS

Les objectifs de cette thèse étaient de proposer des moyens de lutte intégrée contre l'esca ainsi que de comprendre les événements précoces de l'interaction vigne-microbe dans les tissus du bois.

L'équipe Vin, Viticulture et Œnologie du Département des Sciences Agronomiques et Agroalimentaires de l'INP-EI Purpan a initié des recherches sur les maladies du bois durant les 10 dernières années en développant un outil de diagnostic moléculaire des maladies du bois (Pouzoulet 2012). La thématique des maladies du bois est donc assez récente et cette thèse est la première étude des interactions vigne-microbes au sein de cette équipe. Il a donc été nécessaire de mettre en place des techniques nouvelles au sein du laboratoire, décrites dans le **chapitre II Matériels et Méthodes**.

Le **chapitre III Compréhension des interactions précoces entre la vigne et les champignons associés à l'esca** est plus fondamental. Lorsque les deux champignons, considérés comme pionniers dans le complexe de l'esca, *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* sont inoculés dans le bois, il en résulte des symptômes de nécrose et de décoloration des tissus du xylème. Nous

nous sommes attachés à comprendre la colonisation durant les premières semaines suivant l'infection par ces deux agents en utilisant des outils de microscopie confocale. Parallèlement la réponse du bois dans les premières semaines suivant l'inoculation a été observée. L'étude des mécanismes précoces de la réponse de ce tissu a été approfondie grâce à des outils de biologie moléculaire. La première partie de ce chapitre est dédiée à la compréhension histologique des interactions précoces entre la vigne et *P. aleophilum* (Publication n°2), puis de *P. chlamydospora* et de la co-inoculation des deux espèces. La deuxième partie est consacrée à l'étude moléculaire de l'interaction entre la vigne et ces deux espèces de champignons dans les quelques heures suivant l'inoculation. Il s'agit de déterminer si le bois de la vigne induit des défenses dans deux types de tissus ligneux différents. Dans un second temps la spécificité de la reconnaissance des pathogènes par les cellules du bois a été étudiée.

Les différentes méthodes d'inoculation présentées ont permis de tester les effets de différents éliciteurs, bactéries de biocontrôle et molécules oxydatives sur les champignons associés à l'esca *Phaeoacremonium aleophilum* et *Phaeomoniella chlamydospora*. C'est l'objet du **chapitre IV Proposition de moyens de lutte intégrée contre l'esca**. Dans un premier temps, ce chapitre présente un modèle de criblage *in planta* de moyens de lutte contre l'esca en laboratoire (Publication n°3). Ensuite l'utilisation de ce modèle est illustrée par le développement de l'eau ozonée pour limiter l'infection de plaies de taille par *P. aleophilum* en pépinière (Publication n°4).

Enfin l'ensemble des résultats est discuté de manière globale afin d'apporter des perspectives à ce travail **(Chapitre V Conclusion et perspectives).**

Chapitre II : Matériels et méthodes

1 LES CONDITIONS DE CULTURES

1.1 CONDITIONS DE CULTURES DU MATERIEL VEGETAL

1.1.1 Origine des plants

Les sarments de Cabernet-Sauvignon clone 15 utilisés lors des différents travaux de cette thèse proviennent des pépinières Daydé (Gaillac, France) et Mercier (Villesèque, France). Il s'agit de matériel végétal âgé d'un an, destiné à l'obtention de plants greffés. Une fois conditionnés en fagots, les sarments ont été plongés dans un bain de sulfate double d'oxyquinoleine et de potassium, plus connu sous la marque Cryptonol® (0.05%, 1 h, 4°C, Chauvin, France), afin d'éviter les maladies de conservation. Les sarments ont ensuite été stockés en chambre froide à 4°C.

1.1.2 Bouturage

Des sarments de longueur d'entre-nœud et de diamètre homogène ont été sélectionnés. Les sarments ont été débités en boutures à l'aide d'un sécateur préalablement stérilisé à l'éthanol 70% flambé. Les boutures ont ensuite été placées dans un bain d'eau claire javellisée (10 ml pour 20 L d'une solution à 2.6% de chlore actif) durant 30 s, rincées à trois reprises à l'eau claire, pour finalement être plongées dans un bain de sulfate double d'oxyquinoleine (Cryptonol® 0.05%, 16 h, 4 °C, Chauvin, France). Les boutures ont été rincées à trois reprises à l'eau claire et placées dans de la laine de roche autoclavée (121 °C, 15 min) dans une chambre de culture (16 h de jour/8 h de nuit ; 90% d'humidité ; 28 °C). La laine de roche a été humidifiée avec de l'eau autoclavée (121 °C, 15 min) pendant le débourrage des vignes.

1.1.3 Plants bouturés

Une fois débourrées, les vignes ont été rempotées dans un mélange tourbe, sable, perlite (1v/1v/1v) autoclavé deux fois (121 °C, 15 min). Cette étape de rempotage doit avoir lieu au moins une semaine avant le début des traitements afin d'éviter une trop grande influence du stress de rempotage. Les boutures ont ensuite poursuivi leur croissance dans une chambre de culture (16 h de jour/8 h de nuit ; 45% d'humidité ; 25 °C). Les traitements ont été appliqués sur des boutures au stade 6-7 feuilles clairement développées.

1.2 CONDITIONS DE CULTURES DES CHAMPIGNONS

1.2.1 Le maintien des souches

Les souches fongiques *Phaeoacremonium aleophilum* CBS 100398 et *Phaeomoniella chlamydospora* CBS 239.74 ont été utilisées durant ces travaux. Celles-ci ont été maintenues sur de la gélose de pomme de terre Potato Dextrose Agar (PDA, Merck, Allemagne) dans l'obscurité à 26 °C. Un morceau de gélose d'environ 3 mm² a été transféré, en condition stérile, au centre de nouvelles boites de Petri contenant du PDA afin de maintenir en routine les souches au laboratoire.

1.2.2 Suspensions de spores

Certaines expériences nécessitent d'inoculer des spores préparées en condition stérile le jour même. Pour cela un morceau de gélose a été prélevé d'une culture âgée de quatre semaines et transféré dans un tube 1.5 mL contenant 1 mL d'eau déminéralisée autoclavée (121 °C, 15 min). Après agitation au vortex, le tube a été centrifugé (2300 g, 30 s), afin de précipiter les spores dans le fond du tube. Une fois le morceau de gélose retiré, le tube a été centrifugé (2300 g, 30 s) afin de concentrer la solution de spores en prélevant environ 800 µL à partir de la surface du ménisque. Les spores ont ensuite été dénombrées sur cellule de Malassez et la solution ajustée à la concentration souhaitée. Une cellule de Malassez comporte un quadrillage de 100 rectangles dont la surface est couverte par 1 µL. Chacun de ces rectangles est composé de 20 carrés (5x4). Si la distribution des spores dans la solution déposée est homogène, il est alors possible de compter un nombre moyen de spores par carrés. Cette moyenne multipliée par 100 donne la concentration en spores par µL.

2 MODES D'INOCULATIONS DES PLANTS AVEC LE MATERIEL FONGIQUE

2.1 L'INOCULATION EN MODELE PLAIE DE TAILLE

Le modèle plaie de taille correspond à une bouture comportant trois yeux. Deux yeux forment les branches (I et II) tandis que la zone sous le dernier œil engendre le système racinaire. Les plantes ont été stérilisées en surface avec de l'éthanol 70% au niveau de la branche II. Celle-ci a été sectionnée à l'aide d'un ciseau dont les lames ont été stérilisées à l'éthanol 70%

flambé. Une encoche a ensuite été percée dans la plaie de taille avec une perceuse munie d'un foret 3 mm stérilisé. Les plantes ont été inoculées au niveau de cette plaie soit avec la solution de spores, soit avec un plug de mycélium à l'aide d'une seringue 5 mL. D'autres traitements (stimulateurs de défenses ou bien agents de biocontrôle) ont été effectués. Le point d'inoculation a été couvert avec de la cellophane (Figure 21).

2.2 L'INOCULATION EN MODELE ENTRE-NŒUD

Le modèle entre-nœud correspond à une bouture comportant deux yeux. Un œil est à l'origine du système foliaire, le second bourgeon permet le développement du système racinaire. L'entre-nœud de la bouture a été stérilisé à l'éthanol 70% avant d'être percé avec un foret de 5 mm stérilisé à l'éthanol 70% flambé. Cette blessure a été inoculée avec différent traitements avant d'être couverte par de la cellophane (Figure 21).

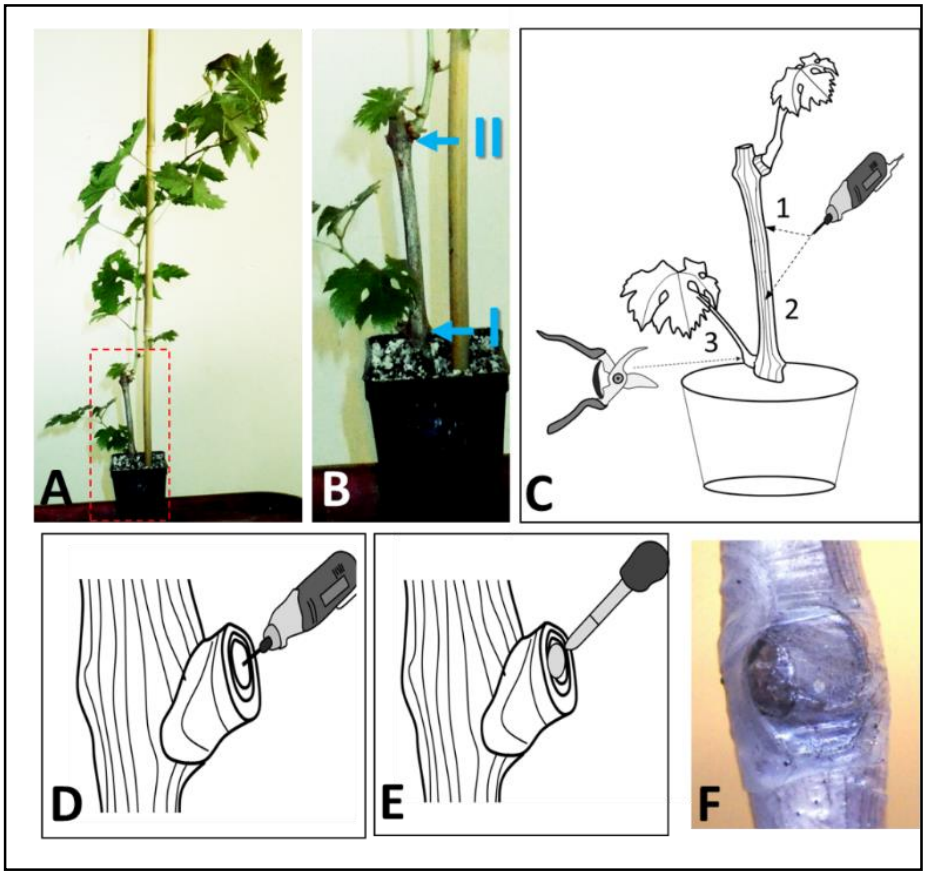


Figure 21 Schéma du modèle d'inoculation mixte. Ce modèle combine modèle plaie de taille et modèle entre-nœud. Dans le cas du modèle entre-nœud, les boutures à trois yeux forment deux branches (B I et II). La branche I est sectionnée(C). Une blessure est réalisée au sécateur (C 1,2,3 et D) afin de déposer le traitement (E). La plaie inoculée est ensuite parafilmée (F). Dans le cas du modèle entre-nœud des boutures à deux yeux sont utilisées et seule la blessure (C 2) est réalisée.

2.3 LE MODELE D'INOCULATION MIXTE

Des boutures à trois yeux ont été inoculées en modèle plaie de taille, et deux inoculations en modèle entre-nœud ont également été réalisées. Ce modèle est utilisé en microscopie afin de comparer la colonisation de deux types de tissus différents (Figure 21).

2.4 L'INOCULATION DES PLUGS DE GELOSE

Les plantes dédiées aux études d'expressions de gènes de défense ont été inoculées avec des plugs de mycélium avec une seringue comme précédemment décrit. Ceci permet de ne pas avoir le décalage de la germination des spores dans les cinétiques d'inductions. Pour chaque espèce, deux plugs ont été inoculés par blessure. Lors de la co-inoculation, un seul plug de chaque espèce a été inoculé, en prenant soin d'inoculer *P. chlamydospora* en premier. Ainsi, pour l'étude d'expression de gènes de défense, la quantité de mycélium inoculée est la même quel que soit le traitement. Si le traitement co-inoculé ressort de l'analyse, la modification de l'induction sera imputable à l'identité « co-inoculation » et non pas au fait que deux fois plus de matériel a été inoculé.

2.5 APPLICATION DE L'EAU OZONEE

Un générateur d'ozone LAB2B (Ozonia, Dubendorf, Suisse) alimenté en oxygène a généré l'ozone. Celui-ci a ensuite été dissous dans 10 mL d'eau déminéralisée stérile en le faisant buller dans un fritté durant 10 min. Le débit d'ozone dans le fritté a été fixé à 10 L/h. Les concentrations d'ozone à l'entrée du fritté étaient de 10, 20 et 60 g/m^3. La concentration en ozone dissous a été calculée suivant l'équation donnée par la loi de Henri :

$$[O_3]_l^* = \frac{\rho_{H_2O}}{M_{H_2O}} \times \frac{R \times T}{He} \times [O_3]_g$$

Où M_{H_2O} est la masse molaire de l'eau en g/mol, R est la constant des gazs parfait (0.082 L atm/mol/ K), T est la température en degrés kelvin, et He est la constate de Henry en atm. Cette constante a été calculée avec l'équation de Roth and Sullivan (Roth & Sullivan 1981) :

$$He = 3.84 \times 10^7 \times [OH^-]^{0.035} \times \exp\left(\frac{-2428}{T}\right)$$

Où ρ_{H_2O} est la densité de l'eau en kg/m^3.

Ces différentes équations ont permis de déterminer les concentrations en ozone dissous correspondant aux trois concentrations d'ozone gazeux appliquées à l'entrée du fritté (10, 20 et 60 g/m^3). Les concentrations en ozones dissous étaient donc respectivement de 2.2, 4.5, ou 13.5 g/m^3 à 20 °C, pH 7, et 1 ATM.

La durée de demi-vie de l'ozone n'excède pas une demi-heure. La solution d'eau ozonée a donc été appliquée le plus rapidement possible sur les boites de Petri ou les plantes. Les modalités d'application ont été détaillées dans la publication n°4.

3 METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

3.1 ARN

3.1.1 Extraction d'ARN

Les échantillons destinés à l'étude de l'expression de gène de défense ont été récoltés dans des tube 50 mL et plongés immédiatement dans de l'azote liquide et conservés à -80 °C. Les échantillons ont été passés dans un broyeur à bille Retsch MM300 (28 oscillations par seconde, 1 min, Retsch, Allemagne). Tout matériel entrant en contact avec l'échantillon (gobelets de broyage, billes, spatules, tubes 50 mL) a préalablement été plongé dans l'azote liquide. Tout réchauffement activerait les nucléases et dégraderait l'ARN présent dans les tissus. Les échantillons broyés ont été conservés à -80 °C.

Environ 150-200 mg de tissus broyés ont été pesés dans des tubes de 2 mL, toujours maintenus dans de l'azote liquide. Les échantillons ont ensuite été stabilisés dans 1 mL de tampon d'extraction ARN à 65 °C (2% CTAB, 2% PVPP, 300 mM Tris, 25 mM EDTA, 2 M NaCl, pH 8, 0,2% β-Mercaptoéthanol ajoutés après autoclavage du tampon à 121 °C pendant 15 min). Les échantillons ont été vortexés immédiatement afin d'homogénéiser la poudre de bois de vigne dans le tampon d'extraction. La lyse des tissus a duré 10 min à 65 °C au bain marie, en vortexant les tubes toutes les 2 min. Suite à cette étape la contrainte de travailler dans de l'azote liquide n'était plus nécessaire, et les étapes suivantes ont été réalisées à 4 °C dans de

la glace. Les échantillons ont été centrifugés (10 000 rpm, 10 min, 4 °C) afin de culotter les débris de broyat. La phase liquide a été transférée dans un nouveau tube 2 mL stérile puis 1v de Phénol / Chloroforme / Alcool Isoamylique (25/24/1) a été ajouté avant de mélanger vigoureusement. Deux phases se forment : la phase supérieure aqueuse contient les acides nucléiques ; la phase inférieure hydrophobe contenant les protéines dénaturées lors de la lyse. Les tubes ont été centrifugés (10 000 rpm, 10 min, 4 °C) afin de bien séparer ces deux phases. La phase aqueuse a été transférée dans un nouveau tube 2 mL stérile et 1v de Chloroforme / Alcool Isoamylique (CIA, 24/1) a été rajouté avant de mélanger vigoureusement les tubes. Les échantillons ont été centrifugés (10 000 rpm, 10 min, 4 °C) et la phase aqueuse transférée dans un nouveau tube 2 mL stérile. Après une seconde étape de nettoyage des protéines au CIA, la phase aqueuse a été transférée dans un tube 1.5 mL stérile. Ensuite ½v de Chlorure de lithium (LiCl, 8 M, autoclavé 121 °C pendant 15 min) a été ajouté afin de précipiter les acides nucléiques pendant 16 h à -80°C.

Les échantillons ont été décongelés dans la glace et centrifugés (10 000 rpm, 30 min, 4 °C). Le surnageant a été prélevé en prenant soin de ne pas pipeter le culot d'acides nucléiques présents dans le fond du tube. Le culot a été resuspendu dans 250 µL de tampon SSTE (0.5% SDS, 1 M NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0, autoclavé à 121 °C pendant 15 min). Cette suspension a été mélangée à 2v d'éthanol absolu par pipetage et directement transférée dans une colonne rose Qiagen (RNeasy plant mini Kit, Qiagen, USA). L'extraction a été poursuivie suivant le protocole fourni par le fabricant. Les acides nucléiques ont été élués dans un volume final de 40 µL d'eau exempte de nucléase fournie par le fabricant. En sortie de purification des acides nucléiques, les échantillons ont été conservés à -80 °C. Ce protocole a été adapté à partir d'un protocole d'extraction d'ADN de bois de la vigne (Pouzoulet et al. 2013b) et d'ARN de fleurs d'eucalyptus (Southerton 1998).

3.1.2 Digestion de l'ADN génomique et transcription inverse (RT)

La densité optique a été mesurée afin d'estimer la quantité d'ARN présent par µL d'échantillons à l'aide du spectrophotomètre BioPhotometer plus (Eppendorf, Allemagne). La dégradation de l'ADN génomique (DNAse) et la transcription inverse (RT) ont été réalisées avec environs 1 µg d'ARN par échantillon. La même quantité d'ARN a été utilisée pour tous les échantillons. A la suite de la réaction de DNAse dans un volume final de 11 µL (1 U / l.30 min at 37 °C, DNase I, RNase free kit, Fermentas, Canada), 1 µL de solution a été dilué dans 9 µL

d'eau distilée exempte de nucléase. Cette dilution a été étiquetée RT-. Les 10 µL restants ont été passés en RT avec le Maxima First strand cDNA synthesis kit for RT-qPCR (Fermentas, Canada) afin de constituer les ADN complémentaires (ADNc) qui seront quantifiés en Reverse Transcriptase – quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR). Cette solution stock a été diluée au dixième afin d'avoir la solution étiquetée RT+. Une réaction de PCR (amorces EF1α ; programme du thermocycleur : (i) dénaturation à 95 °C pendant 2 min, (ii) 35 cycles de 1 min à 95 °C pour la dénaturation, suivit par 1 min à 65 °C pour l'hybridation et 1 min à 72 °C pour l'élongation des brins, (iii) une élongation finale durant 5 min à 72 °C) sur les échantillons RT- et RT+ permet de vérifier qu'il n'y a pas d'ADN génomique contaminant (RT-) et que la qualité des ADNc (RT+) justifie le passage des échantillons en RT-qPCR.

3.1.3 RT-qPCR

Les études d'expression de gènes de défense en RT-qPCR ont été réalisées dans un volume final de 25 µL contenant 12.5 µL de 2X SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), avec le thermocycleur ABI 7500 Real-Time PCR cycler (Applied Biosystems, USA) et le programme associé ABI SDS software v.1.4 sous sa configuration par défaut. La programmation des cycles était la suivante : (i) dénaturation à 95 °C pendant 5 min, (ii) 40 cycles de 5 s à 95 °C pour la dénaturation, suivit par 35 s à 65 °C pour l'hybridation et l'élongation des brins, et (iii) une analyse supplémentaire de la température de fusion des amplicons de 40 min suivant un gradient allant de 60 à 95 °C. Le facteur d'induction relative des gènes d'intérêts (séquences listées Tableau 2) a été calculé suivant la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$(Livak and Schmittgen 2001) en utilisant le gène de ménage EF1α (Terrier et al. 2005). Les standards de qPCR (amplicon spécifique amplifié par les amorces des gènes d'intérêts) ont été purifiés sur gel. Ensuite le produit de purification a été inséré dans un vecteur linéaire de clonage Pjet1.2/blunt puis incorporé dans des *E. coli* compétentes en utilisant le CloneJET PCR Cloning kit (Thermo Scientific, Etats-Unis). Les bactéries ont été cultivées sous agitation (180 rpm, 16 h, 37°C) puis l'ADN plasmidique a été purifié en utilisant le QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Pays-Bas). Ces standards ont été utilisés afin de vérifier que l'efficacité des couples d'amorces utilisés était bien comprise entre 95% et 100%. Cette condition est nécessaire pour appliquer la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tableau 2 Séquences des gènes d'intérêts utilisées lors des études d'expression de gènes.

Amorces	Séquences	Références
EF1-α	F : GAACTGGGTGCTTGATAGGC R : AACCAAAATATCCGGAGTAAAAGA	(Terrier et al. 2005)
LOX	F : CTGGGTGGCTTCTGCTCTC R : GATAAGCCGCAGATTCATGC	(Aziz et al. 2003)
PAL	F : TGCTGACTGGTGAAAAGGTG R : CGTTCCAAGCACTGAGACAA	(Aziz et al. 2003)
PR10.3	F : CGTTAAGGGCGGCAAAGAG R : GCATCAGGGTGTGCCAAGA	(Castro et al. 2008)
PR10a	F : GTTTTGACTGACGGCGTTGA R : TGGTGTGGTACTTGCTGGTGTT	(Figueiredo et al. 2012)
TLb	F : CTGGAGATGTATGGAACTGATAGTG R : TCGGATTTTGAAGACCCTTTAC	(Perazzolli et al. 2010)
CAM	F : TATTCCAGTAGTTTGGGTTGGTAGTG R : AAGAAGCACCAAACAAGAAAGGAG	
GST	F : CACAAAACTACCACCCACCAA R : TCCTCACTCTCTTCAATCACTT	
LOX9	F : CCCTTCTTGGCATCTCCCTTA R : TGTTGTGTCCAGGGTCCATTC	
STS	F : GTGGGGCTCACCTTTCATT R : CTGGGTGAGCAATCCAAAAT	(Belhadj et al. 2008)
PIN	F : GCAGAAACCATTAAGAGGGAGA R : TCTATCCGATGGTAGGGACACT	
STS8	F : AAGACATGTGTTGAGTGAGTATGGTA R : CTCGATGGTCAAGCCTGGT	(Dai et al. 2012)
CWinv	F : ACATTGGCTATTGACGGTGAA R : ACTCACAACTCTACATACATCT	(Polesani et al. 2010)
TL	F : CCTAACACCTTAGCCGAATTCGC R : GGCCATAGGCACATTAAATCCATC	(Spagnolo et al. 2011)
GSTphi	F : GTGATTGCCATGCAGAAGAG R : TTTTTGGTAGAAACGCTTTATGTT	
SOD	F : GTGGACCTAATGCAGTGATTGGA R : TGCCAGTGGTAAGGCTAAGTTCA	
Vv17.3	F : GTACCATCAGACCACCCATAAGTAGTG R : AGACCAACGGCAAATCAAGTG	(Bordiec et al. 2011)

3.2 ADN

3.2.1 Extraction d'ADN de *Vitis vinifera* L.

Les extractions d'ADN ont été réalisées suivant le protocole de Pouzoulet et al. (2013). Les échantillons sont stockés à -20 °C et séchés durant 24 h dans un lyophilisateur Heto (Kalisto, France) avant d'être réduits en fine poudre à température ambiante avec un broyeur Retsch MM300 (60 s, 25 oscillations par secondes, deux fois, Retsch, Germany) dans des gobelets de broyage de 35 mL munis de bille en acier de 20mm (Retsch, Germany). Environ 150 à 200 mg de poudre de bois ont été incubés sous agitation (120 rpm, 1 h) à 65°C dans un tampon d'extraction ADN (2% CTAB, 2% PVPP, 100 mM Tris, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, pH 8.0, 5‰β-Mercaptoethanol and 5‰ RNAse A Qiagen tous deux ajoutés après autoclavage du tampon 121 °C pendant 15 min). ½v de CIA (24/1) a été ajouté avant de mélanger vigoureusement la

solution et d'incuber les tubes à 4 °C pendant 5 min dans de la glace. La solution a été centrifugée (2300 g, 10 min, 4 °C) puis 400 µL de surnageant ont été transférés dans un nouveau tube 1.5 mL stérile. Les étapes suivantes ont suivi les recommandations du protocole fourni avec le DNeasy plant mini Kit (Qiagen, USA), en partant de l'étape d'ajout de 130 µL de tampon AP2. L'ADN a été élué dans 50 µL d'eau stérile exempte de DNAse.

3.2.2 Extraction d'ADN de champignon

Les champignons ont été cultivés sur cellophane dans une boite de Petri contenant du milieu PDA. La cellophane a été transférée dans un mortier autoclavé (121°C ; 15 min) et broyée dans de l'azote liquide. L'extraction a été réalisée en utilisant le kit DNeasy plant mini Kit (Qiagen, USA).

3.2.3 Quantification de copies d'ADN fongique qPCR plexor system

La quantification absolue de l'ADN fongique présent dans les échantillons de bois broyés a été mesurée suivant Pouzoulet et al. (2013) dans un volume réactionnel final de 25 µL contentant 12.5 µL de 2X PlexorTM Master Mix (Promega, USA). Le thermocycleur utilisé était une ABI 7500 Real-Time PCR cycler (Applied Biosystems, USA), accompagnée du programme d'utilisation ABI SDS software v.1.4 paramétré par défaut. La programmation des cycles était la suivante : (i) dénaturation à 95 °C pendant 5 min, (ii) 40 cycles de 5 s à 95 °C pour la dénaturation, suivit par 35 s à 65 °C pour l'hybridation et l'élongation des brins, et (iii) une analyse supplémentaire de la température de fusion des amplicons de 40 min suivant un gradient allant de 60 à 95 °C. Les données brutes de qPCR ont été traitées grâce au logiciel Plexor™Analysis Software version 1.5.6.2 (Promega, USA). La courbe d'étalonnage permettant la quantification absolue des ADN fongiques présents dans le bois a été obtenue en utilisant une série de dilution des standards correspondant aux amorces utilisées.

3.2.4 Standards qPCR Plexor

Les standards de qPCR correspondent à l'amplicon spécifique amplifié par les amorces des gènes d'intérêt. Ces standards sont non seulement indispensables afin d'établir la courbe d'étalonnage lors de quantification absolue, mais ils sont également un contrôle positif utile en PCR. Les amplicons des gènes d'intérêts ont été purifiés sur gel et séquencés afin de vérifier que l'amplification obtenue était bien celle attendue *in silico*. Dans un second temps une fraction de la purification sur gel a été insérée dans un vecteur linéaire de clonage

Pjet1.2/blunt puis incorporée dans des *E. coli* compétentes en utilisant le CloneJET PCR Cloning kit (Thermo Scientific, Etats-Unis). Les bactéries ont été cultivées sous agitation (180 rpm, 16 h, 37°C) puis l'ADN plasmidique a été purifié en utilisant le QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Pays-Bas). Une fraction de ce stock d'ADN est amplifiée avec les amorces correspondant au standard souhaité et le produit d'amplification purifié sur gel avec le QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Pays-Bas). Le nombre de molécules présentes dans l'ADN purifié est obtenu en fonction de la concentration de l'élution final suivant la formule :

$$Nb\ de\ molécules\ (x) = \frac{\mathrm{C} * \mathrm{A}}{\mathrm{bp} * 10^9 * 650}$$

On considérant :

C la concentration de matrice ADN dans l'échantillon en ng / µL ;

A la constante d'Avogadro égale à $6.0221413*10^{23}$molécules / mol ;

bp la taille en paires de bases de l'amplicon ;

650 kDa le poids d'une paire de bases.

4 METHODES DE MICROSCOPIE A FLUORESCENCE

4.1 TRANSFORMATION DE SOUCHES FONGIQUES

Des cultures d'une semaine de *Phaeoacremonium aleophilum* CBS 100398 et *Phaeomoniella chlamydospora* CBS 239.74 ont été transformées afin d'exprimer le gène codant la protéine fluorescente verte (GFP) suivant un protocole existant (Gorfer et al. 2007) utilisant *Agrobacterium tumefaciens* comme vecteur du plasmide pCBCT (Figure 22). Ce vecteur binaire contient le gène codant pour la GFP sous le contrôle du promoteur *toxA*, ainsi que le gène *hph* marqueur de sélection exprimant la résistance à l'hygromycine B. Ce vecteur comporte également un gène de résistance à la kanamycine permettant de sélectionner les *A. tumefaciens* vectrices du plasmide. Une solution de spores a été étalée sur une cellophane placée dans une boite de Petri contenant du PDA afin d'obtenir environ 500 spores par boites. Après une semaine de développement (26 °C à l'obscurité), les cellophanes ont été transférés

sur le milieu Moser induction (contenant 0.2% glucose, 10 mM MES, 2 g/L peptone, 0.2 g/L d'extrait de levures, 0.5 g/L KH_2PO_4, 0.05 g/L myo-inositol, 75 mg/L $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$, 150 mg/L $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 10 mg/L $MnSO_4 \cdot H_2O$, 1 mg/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2% agar and 200µM acetosyringone (AS) + 0.5% glycerol ajoutés après autoclavage 121 °C pendant 15 min; pH 5.3). L'AS (4'-Hydroxy-3',5'-dimethoxyacetophenone) est un composé phénolique végétal essentiel pour la virulence d'*A. tumefaciens* (Bhattacharya et al. 2010) devant être préparé le jour même dans de l'éthanol absolu. En parallèle, *A. tumefaciens* AGL-1 [pCBCT] a été cultivé dans du milieu LB supplémenté avec de la kanamycine (50 µg/mL) sous agitation (180 rpm, 16 h, 30 °C). Les bactéries ont été centrifugées (3000 g; 10 min) afin d'incuber (180 rpm, 6h, 30 °C) dans 2 mL de milieu d'induction *Agrobacterium* (contenant 10.5g/L K_2HPO_4, 4.5 g/L KH_2PO_4, 1 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 g/L sodium citrate, 0.2% glucose, 8 mM $MgSO_4$, 1 mg/L thiamine, 200µM AS, 40 mM MES; pH 5.3).

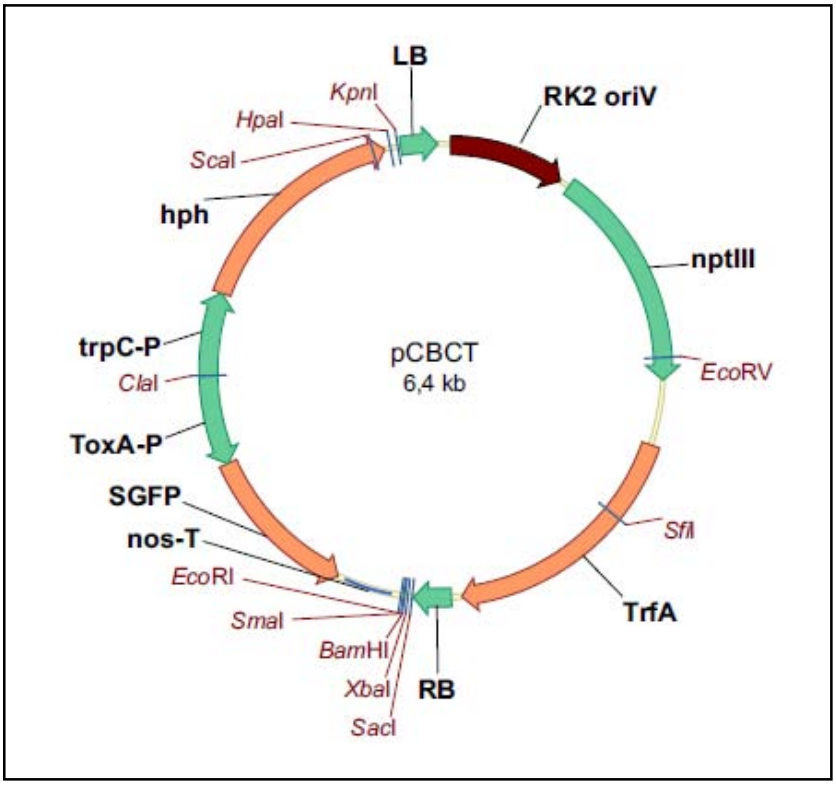


Figure 22 Vecteur pCBCT utilisé pour la transformation des souches P. aleophilum et P. chlamydospora d'après Gorfer et al. (2007). Ce vecteur contient le marqueur de résistance à l'hygB (hph) sous le contrôle du promoteur TrpC d'Aspergillus nidulans, et le gène codant pour la protéine fluorescente verte (SGFP) sous le contrôle du promoteur toxA de Pyrenophora tritici-repentis, entre la bordure gauche (LB) et la bordure droite (RB) de l'ADN de transfère d'A. tumefaciens. Le plasmide est également constitué de la région de réplication RK2 oriV, npIII (neomycine phospotransférase) et TrfA présents à l'origine sur le mini vecteur binaire pCB301.

Mycélium et bactéries ont été co-cultivés en étalant 170 µL d'*A. tumefaciens* AGL-1 [pCBCT] induits avec un Drygalski sur la feuille de cellophane où *P. aleophilum* CBS 100398 s'est

développé pendant une semaine. L'agro-infection a duré cinq jours à température ambiante. Les cellophanes ont été transférées sur milieu Moser sélectif (contenant 1% glucose, 2 g/L peptone, 0.2 g/L d'extrait de levures, 0.5 g/L KH_2PO_4, 0.05 g/L myo-inositol, 75 mg/L $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$, 150 mg/L $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 10 mg/L $MnSO_4 \cdot H_2O$, 1 mg/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 µg/mL Hygromycine B, 100 µg/mL Cefotaxime, 2% Agar, pH 6.0) afin d'isoler les transformants. Après isolation, deux étapes de sélections ont été répétées sur PDA supplémenté en hygromycine B (50 µg/mL), la première à partir d'une solution de spores. Les souches transformées ont ensuite été maintenues sur PDA de la même manière que les souches sauvages, sans qu'il y ait perte de la GFP.

4.2 OBSERVATION AU MICROSCOPE CSLM

4.2.1 Préparation des échantillons *gfp*

La fluorescence de la GFP est sensible à la congélation. Après échantillonnage les sections de bois ont été conservées à 4 °C. Pour la même raison les échantillons n'ont été ni fixés, ni colorés avec une autre technique d'histologie. Les échantillons ont été fendus en deux avec un sécateur stérilisé (éthanol 70%), longitudinalement, en passant par la zone d'inoculation. Les sections ont ensuite été coupées et aplanies avec des lames de scalpel stériles, afin d'obtenir des tranches de bois planes d'environ 1x1x0.5 cm. Ces tranches ont été observées directement ou bien conservées à 4 °C.

4.2.2 Marquage des souches sauvages non-transformées

Les échantillons inoculés avec les souches non transformées sont des contrôles servant à vérifier que la transformation n'a pas altéré leurs virulences. Le mycélium a été marqué avec une sonde non spécifique. Pour cela les coupes de bois ont été incubées 2 h à 28 °C dans 15 ml de PBS contenant 50 µg/mL de Wheat Germ Agglutinin (WGA, lifetechnologies, Etats-Unis), conjuguée avec de la sonde AlexaFluor®488. La WGA, marquée avec ce fluorochrome émettant dans le vert, se lie en particulier à la chitine de la paroi des champignons.

4.2.3 Prises et traitements des images

Les observations ont été réalisées avec un microscope confocal (Olympus Fluoview FV1000 avec un laser multi-ligne FV5-LAMAR-2 et un laser HeNe(G)laser FV10-LAHEG230-2). Les

objectifs 10x, 20x et 40x ont été utilisés. Des images Z ont été prises séparément pour chaque longueur d'onde 405, 488 et 549 nm, correspondant respectivement aux émissions bleu, verte et orange-rouge, tous autres paramètres du microscope restant inchangés. Le logiciel Imaris a été utilisé au microscope confocal pour visualiser des reconstructions 3D. Entre 20 et 40 fichiers image Z ont été faits pour chaque traitement biologique. Chaque fichier Z contenait entre 20 et 60 plans avant d'être compiler en une seule image. Les images Z prises avec les différents filtres de fluorescence ont été rassemblées (RGB). Ces opérations ont été réalisées grâce au logiciel image J software 1.47v.

5 ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (R Core Team 2013). Les jeux de données ont tout d'abord subi une analyse descriptive afin d'être nettoyés de toutes erreurs de l'expérimentateur lors de la saisie des valeurs. Ensuite la distribution des valeurs entre les différents traitements a été testée en qqplot afin de déterminer si les valeurs suivaient une distribution normale. Si les conditions de normalité étaient respectées, alors l'utilisation d'un modèle linéaire tel que l'analyse de variance a été préférée. Les traitements significativement différents ont été séparés en utilisant le test post-hoc de Tukey. Les données de cinétiques d'inductions de gènes ont nécessité une transformation avec le logarithme népérien. Lorsque les données ne respectaient pas les conditions de normalité, un test non-paramétrique a été choisi. Le seuil de tolérance de l'erreur de type 1 (α) a été fixé à 0.05.

Chapitre III : Compréhension des interactions précoces entre la vigne et les champignons associés à l'esca

L'inoculation de *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* dans le bois suite à une blessure cause des nécroses et des décolorations. Ces deux espèces sont associées aux vaisseaux du xylème et aux fibres entourant ces vaisseaux. Cependant, les évènements de la colonisation précoce du bois ne sont pas connus. Une étude histologique a été menée afin de déterminer quels sont les tissus envahis en priorité par *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* six et douze semaines après inoculation. D'autre part, l'entre-nœud des boutures de Cabernet-Sauvignon semble réagir différemment suite à l'inoculation de *P. aleophilum* ou *P. chlamydospora* (Pouzoulet 2012). La cicatrisation de la blessure est moins active lorsque les plantes sont inoculées avec *P. chlamydospora* (Pouzoulet et al. 2013). Il semblerait donc que le bois de la vigne mette en place le tissu cicatriciel de manière différente en présence d'un pathogène. La réponse des tissus du bois a été observée en microscopie à fluorescence. Enfin, les mécanismes de la réponse du bois ont été étudiés avec des techniques de biologie moléculaire.

1 APPROCHE HISTOLOGIQUE DES INTERACTIONS PRECOCES DE L'ESCA

La spécificité est un problème important lors de l'étude de la colonisation des champignons du bois. En effet la multiplication des plants de vigne est principalement réalisée par bouturage. Les vitroplants seraient une option envisageable si le modèle d'étude n'était pas le bois. Attendre que les plants lignifient serait trop long et laborieux. Afin d'être certain d'observer les espèces ciblées par l'étude, il était donc nécessaire de marquer de manière spécifique les espèces inoculées. Des souches transformées de *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* exprimant le gène codant la protéine GFP ont été développées pour permettre cette étude microscopique.

1.1 LES EVENEMENTS PRECOCES DE LA COLONISATION DU BOIS DE *VITIS VINIFERA* L. PAR *PHAEOACREMONIUM ALEOPHILUM*

1.1.1 Généralités

L'esca est devenue une menace majeure pour la viticulture. *Phaeoacremonium aleophilum* est l'un des champignons pionniers formant le complexe associé à l'esca. Toutefois la colonisation de cette espèce dans le bois de la vigne est peu documentée. La publication « **Deciphering**

the niches of colonisation of *Vitis vinifera* L. by the esca–associated fungus *Phaeoacremonium aleophilum* using a *gfp* marked strain and cutting systems." présente la colonisation de *P. aleophilum* à 6 et 12 semaines après inoculation, en utilisant un microscope confocale et en marquant une souche avec le gène *gfp*. La souche transformée *P. aleophilum*::*gfp7* a été observée en microscopie à fluorescence, ainsi que la souche sauvage marquée grâce à la sonde Alexa Fluor® 488 WGA. La colonisation a été observée dans deux types tissus : au niveau de l'entre-nœud (inoculation en modèle entre-nœud) et au niveau nodal (inoculation en modèle plaie de taille) dans le bois de boutures de Cabernet-Sauvignon réalisées à partir de sarments âgés d'un an. L'objectif de cette étude est de mieux comprendre la colonisation de *P. aleophilum*. D'autre part, il s'agira d'observer si la colonisation, ainsi que la réponse de la plante à l'inoculation, varient suivant le modèle d'inoculation testé.

1.1.2 Publication N°2 : Deciphering the niches of colonisation of *Vitis vinifera* L. by the esca–associated fungus *Phaeoacremonium aleophilum* using a *gfp* marked strain and cutting systems.

Romain Pierron[1,2], Markus Gorfer[2,3], Harald Berger[3], Alban Jacques[1], Angela Sessitsch[3], Joseph Strauss[2,3] and Stéphane Compant[3*].

[1] *Université de Toulouse, Equipe Vins Viticulture et Œnologie, Département des Sciences Agronomiques et Agroalimentaires, INP-EI Purpan, 75 voie du T.O.E.C. BP57611, 31076 Toulouse cedex 3, France.*

[2] *University of Natural Resources and Life Sciences, Department of Applied Genetics and Cell Biology, 3430 Tulln, Austria.*

[3] *AIT Austrian Institute of Technology GmbH, Health & Environment Department, Bioresources Unit, Konrad-Lorenz Straße 24, 3430 Tulln, Austria.*

Abstract *PlosOne (accepted with minor modifications)*

Esca disease has become a major threat for viticulture. *Phaeoacremonium aleophilum* is considered a pioneer of the esca's complex pathosystem, but its colonisation behaviour inside plants remains poorly investigated. In this study, *P. aleophilum*::*gfp*7 colonisation was assessed six and twelve weeks post-inoculation in two different types of tissues: in the node and the internode of one year-old rooted cuttings of Cabernet Sauvignon. These processes of colonisation were compared with the colonisation by the wild-type strain using a non-specific lectin probe Alexa Fluor® 488 WGA. Results showed that six weeks post inoculation of the internode, the fungus had colonised the inoculation point, bark and xylem fibres. Bark, pith and xylem fibres were strongly colonised by the fungus twelve weeks post inoculation and can progress up to 8 mm from the point of inoculation using pith, bark and fibres. *P. aleophilum* was additionally detected in the lumen of xylem vessels in which tyloses blocked its progression. Different plant responses in specific tissues were additionally visualised. Inoculation of nodes led to restricted colonisation of *P. aleophilum* and was associated with a plant response six weeks post inoculation before that, the fungus was detected in xylem vessels, bark and inside pith from the point of inoculation.

These results demonstrate that P. aleophilum colonisation can vary according to the type of tissue and the type of spread using pith, bark and fibres. Woody tissues can respond to the injury and to the presence of this fungus, and xylem fibres play a key role in the early colonisation of the internode by P. aleophilum before the fungus can colonise xylem vessels.

Keywords: Grapevine, trunk disease, esca, *Phaeoacremonium aleophilum*, colonization

Introduction

During the last twenty years, grapevine trunk diseases (GTDs) in general and esca in particular has become one of the major concerns in viticulture [1,2]. GTDs affect 12% of the French vineyard, suffering from different pathologies such as Eutypa dieback, Botryosphaeria dieback or esca disease. Esca has become particularly important for winegrowers since the banning of sodium arsenite due to its toxicity towards humans and the environment [3]. This disease causes significant losses of production and imposes severe threats by increasing plant renewal rate in mature vineyards [4]. No current solution can worldwide prevent this disease, although esca is probably known since ancient Greek times [5]. It is characterised by a brown red discoloration and black streaking in the xylem (considered as 'young esca') with the later development of a white rot in the trunk ('esca proper'). Both young esca and esca proper in the trunk are associated with leaf tiger stripe symptoms as well as symptoms on berries [6–8]. Plants with heavily damaged trunks may suddenly die due to esca symptoms. The etiology of this disease is not yet well understood [1] but the inoculum source of fungi related to the disease may be soil, air dispersal of spores, insect vectors and/or contamination during grafting processes throughout roots, pruning or natural wound colonisation [9,10]. The original inoculum may also be present in the cuttings from already infected mother vines [11].

A cocktail of microbes can be responsible for the full development of esca trunk disease [1]. Albeit *Phaeomoniella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & L. Mugnai) Crous & W. Gams [12] and *Phaeoacremonium aleophilum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & L. Mugnai [13] are the principal tracheiphilous hyphomycetes associated with black streaking and brown-red wood [6,7], other fungi have been associated with esca symptoms in Europe, notably the wood-rotting basidiomycete *Fomitiporia mediterranea* Fischer, and occasionally *Stereum hirsutum* (Willd.: Fr) S. F. Gray [7]. Additional fungi, i.e. *Eutypa lata*, and *Botryosphaeriaceae* species, as well as several *Phaeoacremonium* spp. have been isolated from the trunks of plants showing esca disease [7,14], as several diseases occur at the same place and fungi associated with these diseases may also be present at the same time as esca. However, *P. aleophilum* has been considered as a pioneer in esca disease infection, because this fungal agent is frequently isolated from trunks of plants presenting 'young esca'. This microbe was isolated from plant tissues when decay development started in the trunk together with *P. chlamydospora*. Consequently *P. aleophilum* is an interesting model microorganism to study grapevine-microbe interaction as well as for understanding esca development. A better knowledge of the niches colonised by this fungus inside plants is required.

The necessity of injury for infection by *P. aleophilum* has been investigated on single-bud cuttings of cv. Cabernet Sauvignon [15] using scanning electron microscopy. The pathogen was able to penetrate uninjured roots and shoots without passing by stomata, and colonised its host plant especially in the intercellular spaces of the epidermis, as well as inside the cortex

and the pith. Both phloem and xylem vessels were also colonised, with the latter more extensively [15]. Isolation from dormant cuttings buried in conidia-inoculated sand revealed that *P. aleophilum* is able to invade cv. 'Chardonnay' more successfully than *P. chlamydospora*. This study stressed the importance of the node in the infection cycle of *Phaeoacremonium* species [16]. Electron microscopy analysis revealed that *P. aleophilum* is a vascular pathogen colonising wood fibres, xylem vessels as well as pith [17]. Using a FITC-WGA assay, Fleurat-Lessard et al. [18] visualised *P. aleophilum* one year after inoculation in several parts of the trunk of infected cuttings of cv. Ugni blanc, mainly in xylem vessels and fibres, but also inside proto-xylems, pith and rays.

Grapevine colonisation by *P. chlamydospora* is better documented than for *P. aleophilum* [17,19] and Troccoli et al. [20] described the use of different staining techniques to observe grapevine trunk pathogens *in planta*. In addition to immunological detection developed by Fleurat-Lessard et al. [18], as well as other techniques enabling the detection of fungi in general, the use of marker genes (e.g. *gfp*) may be used to study the colonisation of grapevine trunk disease-associated fungi [21–24]. There is not yet, however, a study concerning the colonisation of *P. aleophilum* using a *gfp* marker, but such a study would enable a better understanding of the niches colonised by *P. aleophilum*.

In this study *gfp* tagged transformants of *P. aleophilum* were created using *Agrobacterium* mediated transformation. The process of colonisation was then studied on cuttings of Cabernet Sauvignon plants after two types of inoculation: first in the internode of one year old woody tissue already lignified, second in the node of a newly developed branch after pruning. Colonisation behaviour of *P. aleophilum* was further determined using the wild-type fungus with Alexa Fluor® 488 WGA to elucidate which niches can be colonised by the phytopathogenic fungus.

Material and Methods

Fungal strains and preparation for transformation

Phaeoacremonium aleophilum CBS 100398 was maintained on potato dextrose agar medium (PDA, Merck, Germany) on petri dishes placed in the dark at 26°C. Prior to transformation, a test was performed to determine whether this strain was sensitive to different concentrations of hygromycine B (25 $\mu g.mL^{-1}$, 50 $\mu g.mL^{-1}$, 75 $\mu g.mL^{-1}$ and 100 $\mu g.mL^{-1}$) in PDA medium.

The transformation protocol required a conidial suspension of *P. aleophilum*. A plug of hyphae from a 3 week-old culture was placed in 1 mL of autoclaved demineralised water (121°C, 15min) in a 1.5 mL tube to make a conidia solution. The tube was then briefly vortexed and

centrifuged for 30 s at 2300 x g. The plug of hyphae was then removed and the tube centrifuged again for 30 s at 2300 x g to allow precipitation of fungal conidia at the bottom of the tube. The conidial suspension was then concentrated by pipetting the upper part of the solution to obtain a final volume of 200 µL and the concentration was adjusted with a counting chamber (Malassez cell) to obtain 10^4 to 10^5 conidia μL^{-1}.

Fungal transformation

Agrobacterium-mediated transformation of *P. aleophilum* CBS 100398 with plasmid pCBCT was carried out on young, growing hyphae from a fresh *P. aleophilum* conidial suspension according to Gorfer et al. [25]. The binary vector pCBCT contains *gfp* under the control of the strong *toxA* promoter [26] and the hygromycine resistance marker *hph*. Briefly, 50 µL of the *P. aleophilum* solution was sprayed on an autoclaved cellophane layer that was previously placed on PDA medium in a Petri dish. Fungal hyphae developed for one week before transferring the cellophane on a Moser-Induction medium (containing 0.2% glucose, 10 mM MES, 2 $g.L^{-1}$ peptone, 0.2 $g.L^{-1}$ yeast extract, 0.5 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4, 0.05 $g.L^{-1}$ myo-inositol, 75 $mg.L^{-1}$ $CaCl_2.2\ H_2O$, 150 $mg.L^{-1}$ $MgSO_4.7\ H_2O$, 10 $mg.L^{-1}$ $MnSO_4.H_2O$, 1 $mg.L^{-1}$ $ZnSO_4.7H_2O$, 2% agar and 200 µM acetosyringone (AS) + 0.5% glycerol added after autoclaving; pH 5.3). *A. tumefaciens* AGL-1 [pCBCT] was in parallel cultivated overnight on a shaker (180 rpm) at 30°C in LB medium amended with 1% glucose and kanamycin (50 $\mu g.mL^{-1}$). Bacterial cells were then centrifuged (3000 x g; 10 min) and the pellet was re-suspended in 2 mL of an *Agrobacterium*-induction medium (containing 10.5 $g.L^{-1}$ K_2HPO_4, 4.5 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4, 1 $g.L^{-1}$ $(NH_4)2SO_4$, 0.5 $g.L^{-1}$ sodium citrate, 0.2% glucose, 8 mM $MgSO_4$, 1 $mg.L^{-1}$ thiamine, 200 µM AS, 40 mM MES; pH 5.3) and incubated for 6 h at 30°C on a shaker (180 rpm).

For co-cultivation, 170 µL of induced AGL-1 [pCBCT] were spread with a Drigalsky spatula on the cellophane where *P. aleophilum* CBS 100398 had been growing for five days. Plates were then incubated at room temperature for five days. The cellophane was transferred onto a Moser selective medium (with 1% glucose, 2 $g.L^{-1}$ peptone, 0.2 $g.L^{-1}$ yeast extract, 0.5 $g.L^{-1}$ KH_2PO_4, 0.05 $g.L^{-1}$ myo-inositol, 75 $mg.L^{-1}$ $CaCl_2.2\ H_2O$, 150 $mg.L^{-1}$ $MgSO_4.7\ H_2O$, 10 $mg.L^{-1}$ $MnSO_4.H_2O$, 1 $mg.L^{-1}$ $ZnSO_4.7H_2O$, 50 $\mu g.mL^{-1}$ HygB, 100 $\mu g.mL^{-1}$ Cef, 2% Agar, pH 6.0) to isolate fungal transformants.

Transformants were transferred on a fresh selection medium. After two selection rounds, a conidia solution was sprayed on a new plate containing selection medium. This selection from conidia solution avoids the presence of heterokaryons. Hyphae developing from conidia was transferred once more on selection medium and maintained then on PDA medium. A few hyphae were mounted in sterile water with a cover slide and compared to wild-type *P. aleophilum* and observed under a confocal microscope (described in another section).

Plant material

One year-old canes of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon clone 15 were harvested in January 2013 and 2014 (Toulouse, Midi-Pyrénées, France) and treated with fungicide by soaking canes in 0.05% Cryptonol® for one hour. Cleaned canes were stored at 4°C until further processing. Canes were divided into cuttings harbouring three dormant buds and cleaned in a 20 L water bath containing 10 mL of bleach (2.5% active chloride) for 1 min before rinsing two times with tap water. Cuttings were then stored at 4°C overnight in a solution of 0.05% Cryptonol®. Plant material was cleaned with three successive washes in baths of sterile tap water and planted in plastic trays filled with moistened autoclaved glass-wool. Plants were placed in a growing chamber (photoperiod 16/8, 25°C; 90% humidity) and were watered with autoclaved tap water. Budding and rooting took four to six weeks before cuttings were potted in 75 cL pots containing a sterile mixture of perlite, sand and turf (1:1:1 v/v). Cuttings were then transferred to a growth chamber (photoperiod 16/8, 25°C; 45% humidity) and plants remained there for at least one week before treatments to avoid potting stress (cf. Figure 1A).

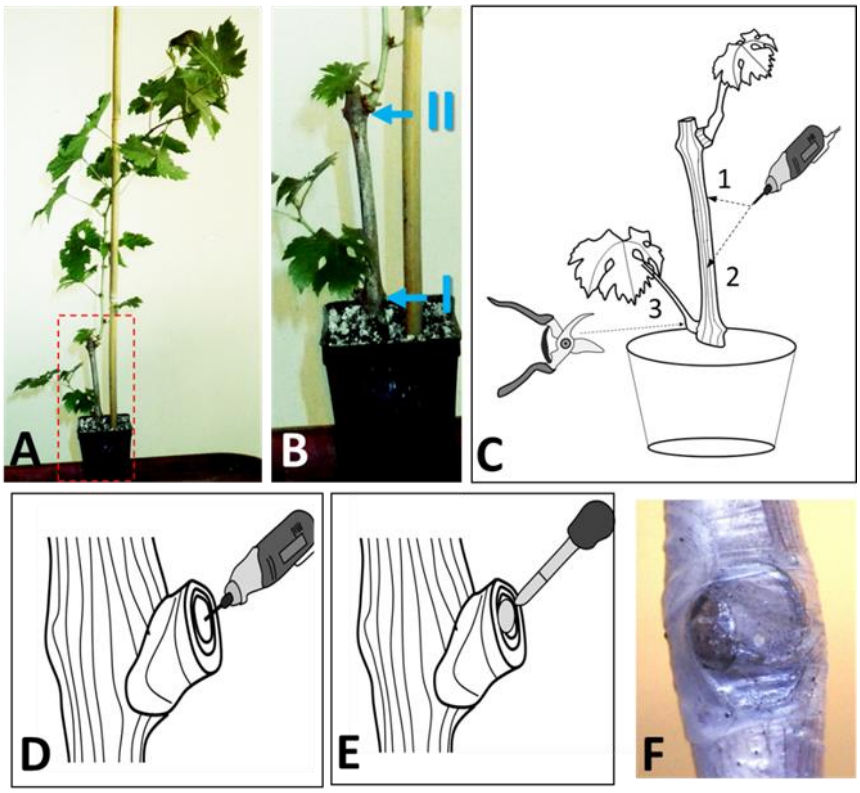


Figure 1: The inoculation model. A) A three noded cutting of Cabernet Sauvignon clone 15 is made so that one node is inside the soil and the two other nodes give shoots. B) Two young branches will form annotated branch I and branch II. C) Two internodal damages are realised with a driller (1 and 2). A pruning damage is done at the nodal level by cutting branch I. D) A small wounding is made in the pruning injuries to receive the plug of the fungus to be inoculated. E) A plug of peripheral hyphae is inoculated in the internodal or nodal damage. F) The inoculation is covered with cellophane.

Plant inoculation

Cuttings (n = 70) were inoculated when at least six leaves were fully developed. Firstly, cuttings were partly surface-sterilised with a tissue sprayed with 70% ethanol. For each sampling time (6 and 12 weeks) plants were inoculated with hyphae of *P. aleophilum*::*gfp*7 (n=10) from three PDA plates or wild-type strain of *P. aleophilum* (n=10) grown on PDA. Mock-treated plants (n=10) were inoculated with sterile PDA medium. Three inoculations were performed on each plant - two in the internode and one at nodal level as outlined below (Figure 1). Inoculations were performed with one syringe per treatment to ensure that the same quantity of hyphae was injected.

Internodal inoculation

Wounding damage at the internode was made using a drilling machine with a 3 mm drill head (Figure 1C). Inoculations in the same internode were separated by 3 cm along the cane and by a 90° angle as depicted in Figure 1C. A cylindrical plug (3 mm long and 1 mm diameter) of *P. aleophilum*::*gfp*7 growing on PDA medium was applied to the wound. The wild-type *P. aleophilum* CBS 100398 or control medium were applied in the same way. Only hyphae in the periphery of the growing fungus were collected to avoid the danger of selecting fungal material at a different reproductive stage or with different cell activity at different locations on the same plate. After inoculation, the wound was covered with cellophane (Figure 1).

Node inoculation

For node damage, the branch formed from the middle node ("I" in Figure 1B) was cut with an ethanol-flamed blade (Figure 1C). Then a wound was made at this nodal level with an ethanol flamed 3 mm drill (Figure 1D). A plug of peripheral hyphae of wild-type strain of *P. aleophilum* and *P. aleophilum*::*gfp*7 growing on PDA was transferred to the wounding damage as described before (Figure 1E) and control plants were inoculated with PDA medium. Inoculated injuries were covered with cellophane (Figure 1F).

Following inoculation at both internodal and node levels, plants were maintained in the growing chamber, under the same conditions, and watered every second day with autoclaved tap water. Plants were then harvested six or twelve weeks post inoculation for microscopy.

Plant sampling and preparation for confocal laser scanning microscopy

At sampling for microscopy, plants inoculated with *P. aleophilum*::*gfp*7 and mock treated plants were cut longitudinally or transversely with secateurs and stored one week at 4°C (*P. aleophilum* does not grow at 4°C; see [17,27]) before longitudinal and transverse sections were observed under a confocal microscope.

Similar preparation was done for wild-type *P. aleophilum* CBS 100398 or an additional set of mock treated plants excepted that the cuttings, after longitudinal or transversal sections, were immersed in 15 ml of phosphate buffer saline (PBS, pH 7.2) containing 50 µg ml-1 of wheat germ agglutinin (WGA)-AlexaFluor®488 conjugate (Life Technologies, USA) and incubated 2 hours at 28°C before rinsing three times with PBS and observed under the confocal microscope. Wheat germ agglutinin preferentially binds to the chitin of fungi. This staining is universal to fungi and thus all species presents in the plant, *P. aleophilum* included, can be marked with this WGA-AlexaFluor488 conjugate.

Similar preparation was carried out for samples at six or twelve weeks post inoculation. All the data result from observations of ten cuttings of each treatment (wild-type strain of *P. aleophilum*, *P. aleophilum*::*gfp*7 and mock at six weeks post inoculations and the same numbers twelve weeks post inoculations).

Confocal laser scanning microscopy

All observations of pure hyphae or treated plants were carried out using a confocal microscope (Olympus Fluoview FV1000 with multi-line laser FV5-LAMAR-2 and HeNe(G)laser FV10-LAHEG230-2, Japan). No treatments were applied to the tissues prior to observation to avoid destruction or reduction of the GFP signal from inoculated plants or for pure hyphae of wild-type strain of *P. aleophilum* or *P. aleophilum*::*gfp*7. Similar experiments were done for WGA-AlexaFluor488 assay.

Observations with the confocal microscope were done at objectives of 10x, 20x and 40x and between 20 and 40 X, Y, Z pictures containing 20 to 60 scans were separately taken at 405, 488, 549 nm wavelengths in blue/green/orange-red channels respectively, with the same settings each time. Imaris software was used at the confocal microscope to visualise 3D reconstructions. X, Y, Z pictures from different channels were then merged (RGB for red, green and blue merging) using the image J software 1.47v, and Z project stacks were then used to create the pictures (as described in [28]).

Results

CSLM microscopy from a pure culture of *P. aleophilum*::*gfp*7

P. aleophilum CBS 100398 was successfully transformed with the *gfp* gene. Among seven transformed strains, strain n°7 transformed *P. aleophilum* (*P. aleophilum*::*gfp*7) was selected for further experiments as it presented an intense green fluorescence when exposed to UV light (Figure 2A-C). The GFP signal was intense and continuous all over the hyphae, although occasionally punctuated distribution of the GFP signal in hyphae could be observed (see Figure 2B). Conidia were mostly aggregated and also marked with the GFP signal (Figure 2C). The wild-type strain did not present any autofluorescence that could lead to a background signal. No differences in growth between the *gfp* transformant and the wild-type were recorded after fungi were grown on PDA medium (data not shown).

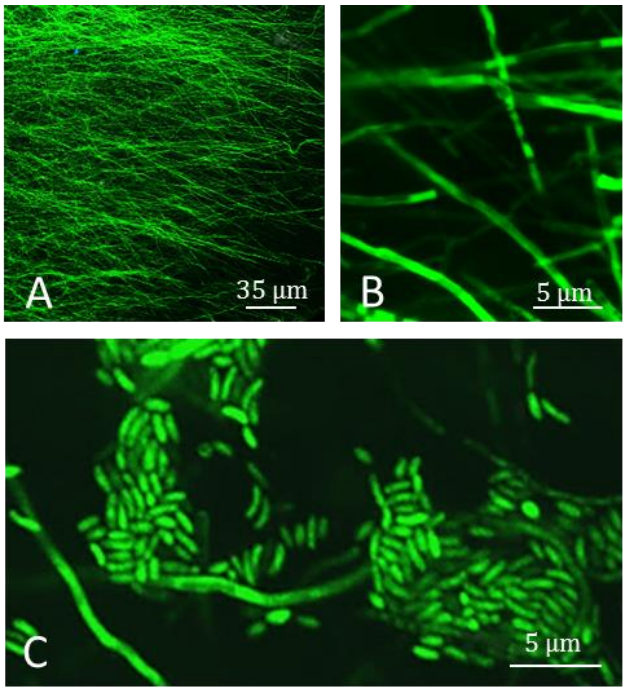


Figure 2: CSLM observation of Phaeoacremonium aleophilum::gfp7 from a pure culture. A) Peripheral hyphae from plate showing strong GFP fluorescence. B) Magnification of the hyphae and hyphae with punctuated fluorescence can be occasionally seen. C) Both hyphae and conidia are green fluorescent.

CSLM microscopy of *P. aleophilum*::*gfp*7 six weeks post inoculation

At the internode level and in transverse sections, the inoculation point was still clearly visible six week post inoculation (Figure 3A). The bark and xylem vessels were damaged (Figure 3A). At low magnification hyphae of *P. aleophilum*::*gfp*7 were detected at the inoculation point (Figure 3A).

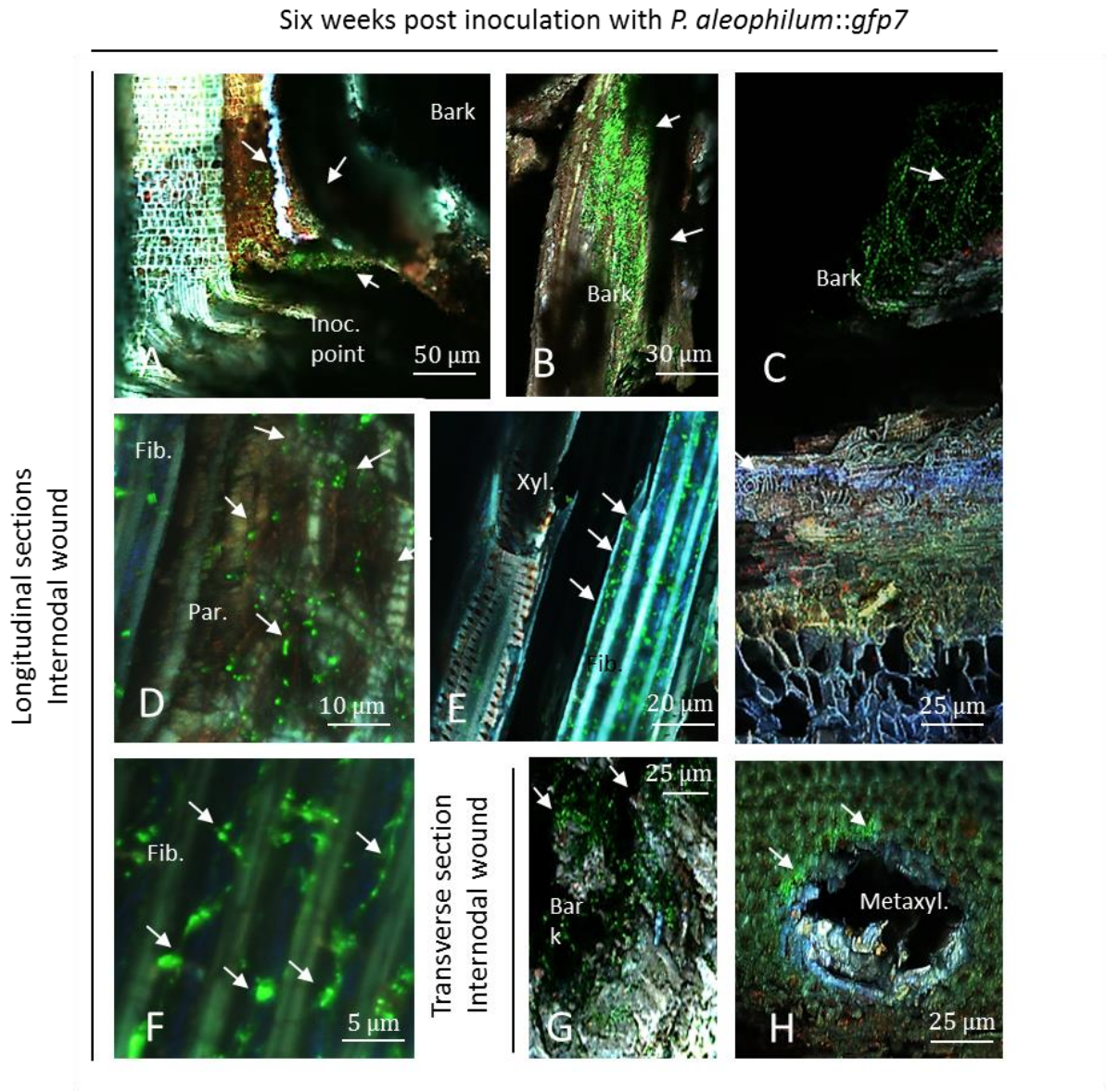


Figure 3: Observation of internodal longitudinal (A-F) and transverse (G-H) sections of Cabernet Sauvignon clone 15 cuttings challenged with P. aleophilum::gfp7 (arrows) six weeks post-inoculation. A) Inoculation point colonised by P. aleophilum::gfp7. B) Strong presence of hyphae in the bark surrounding the inoculation point. C) Damaged bark covered with P. aleophilum::gfp7 hyphae next to wood tissues of the grapevine trunk. D) Xylem parenchymal cells colonised by P. aleophilum::gfp7, close to xylem fibres. E-F) Hyphae and conidia are localised in xylem fibres, while scarce colonisation of xylem vessel elements are reported. G-H) Transverse section showing the localisation of P. aleophilum::gfp7 in bark and in xylem fibres surrounding xylem vessels. Fib.: fibres, Inoc. point: inoculation point, Par.: Parenchyma, Metaxyl.: metaxylem, Xyl. : xylem.

The wood fibres separating xylem vessels and parenchyma were strongly colonised in the two mm next to the wound by short hyphae or germinated conidia (Figure 3E). Hyphae detected in Figure 3E seemed more punctuated than the ones observed from pure fungal culture (Figure 2) and short hyphae or alternatively conidia were detected. Observations at higher magnification confirmed that the pathogen was inside wood fibres, marked by a GFP signal

punctuated among the hyphae (Figure 3F). Figure 3F illustrates the abundance of short hyphae in fibres that might have colonised the surrounding xylem vessel.

The hyphae were surprisingly thin in comparison to hyphae developing on PDA medium (see Figure 2C and Figure 3F). Short *P. aleophilum*::*gfp*7 hyphae clearly colonised the trunk along the fibres six weeks post inoculation whereas even at high magnification the spreading from fibre to fibre remains speculative (Figure 3F). Hyphae of *P. aleophilum*::*gfp*7 were rarely observed in xylem vessels. One signal can be seen in the lumen of xylem vessels in Figure 3E but among all plants analysed, only one colonisation of xylem vessel lumen was found six weeks post inoculation.

Hyphae of *P. aleophilum*::*gfp*7 were also detected at the inoculation point when observing transverse sections (Figure 3G-H). Transverse sections also confirmed that the bark surrounding the inoculation point was covered by hyphae and conidia (Figure 3G). This observation also confirmed the colonisation of fibres surrounding the metaxylem vessels (Figure 3H). No signal was detected in control plants inoculated with a plug of sterile PDA medium (data not shown). Inoculation of *P. aleophilum*::*gfp*7 in an internodal injury was successful and led to more successful colonisation of thin hyphae in xylem fibres compared to other tissues.

Hyphae of *P. aleophilum*::*gfp*7 were detected at the inoculation site in damaged nodes (Figure 4A) but did not colonise the trunk any further six weeks post inoculation. In this model, plants inoculated with the transformed fungus responded strongly by forming a reaction (Figure 4A-B). Mock-treated plants also presented a reaction zone but of a lesser intensity ranging from the ones of Figure 4C to Figure 4D. In the reaction associated with the *P. aleophilum*::*gfp*7 a higher fluorescence of blue, pink and green cells was observed compared to the reaction zone in the node of mock plants six weeks post inoculation (Figure 4A-B and 4C-D). This reaction has been observed in all samples but the observed plant responses did not completely cover the inoculation point. Figure 4E shows hyphae reaching some of the injured tissues, without the same reaction zone, i.e. white, due to combination at the same place of blue, green and red fluorescing signals (due to merging RGB), but the GFP signal seemed to decrease in intensity as the hyphae approached plant tissues (Figure 4E-F). At the contact of this responding plant tissue the GFP signal totally disappeared, with a brown coloration of the hyphae appearing (Figure 4E-F). A layer of necrotic cells was observed between the inoculation point and the reaction zone (Figure 4G). This zone, next to the inoculation point, was colonised by *P. aleophilum* six weeks post inoculation. Interestingly, this cell zone was filled in some samples with multiple ovoid granules, which were not observed in control plants (Figure 4H-I).

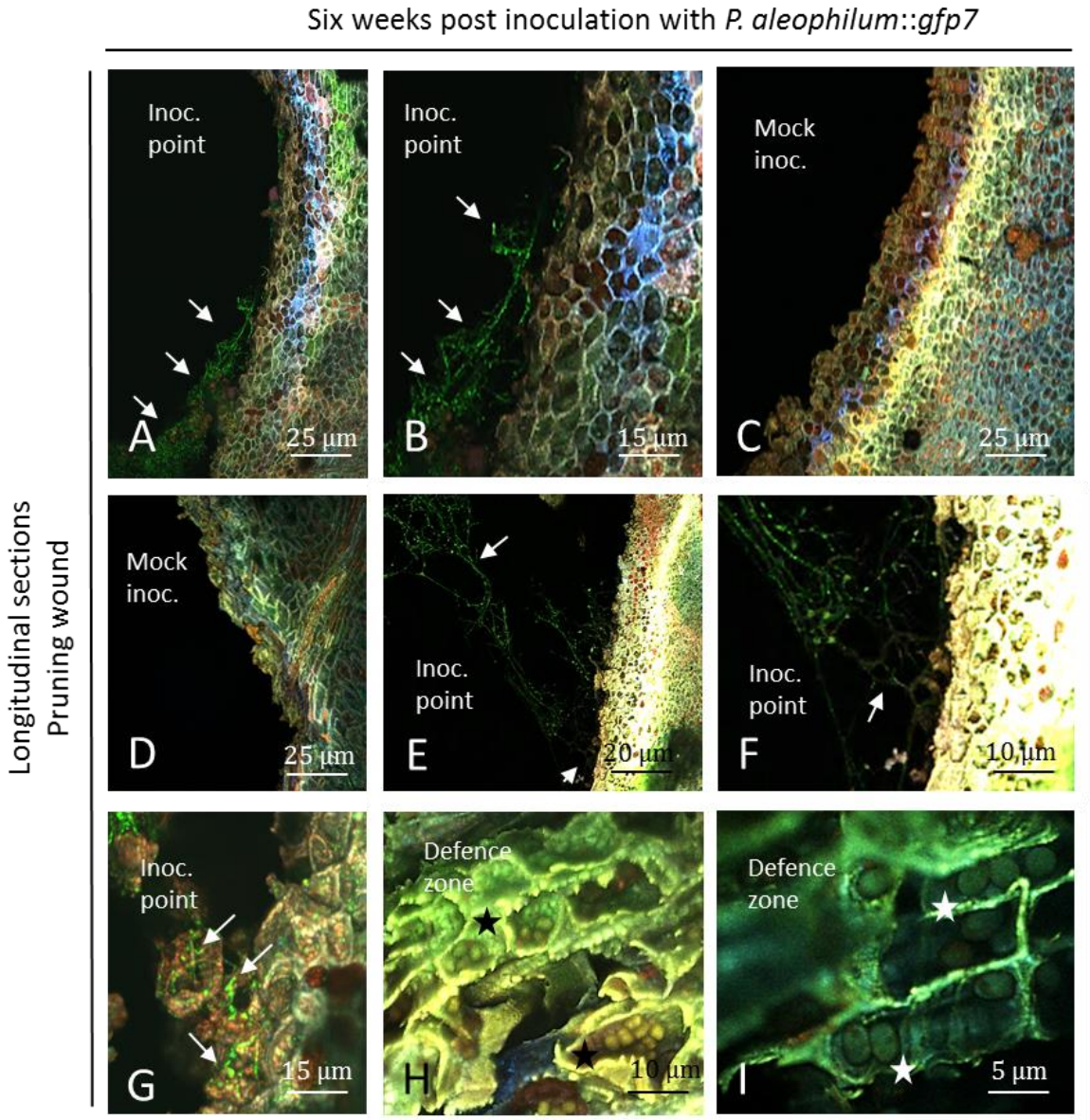


Figure 4: Observation of nodal transverse (A-H) sections of Cabernet Sauvignon clone 15 cuttings challenged with P. aleophilum::gfp7 (arrows) six weeks post-inoculation. A) Inoculation point showing P. aleophilum::gfp7 and a strong plant response, as indicated by blue, pink and green fluorescence. Sometimes this plant defence reaction was yellow/white fluorescent. B) P. aleophilum::gfp7 seems to be impacted by the plant response because no hyphae was observed in front of the plant reaction zone. C-D) The wounding damage also induces plant responses in control plants ranging from clearly visible (C) to hardly visible (D), but always of lower intensity than the plant inoculated with fungal hyphae, and with blue, pink and yellow greenish fluorescence. E-F) The GFP signal disappeared from hyphae when hyphae reaching a white/yellow zone. G) A necrotic layer of cell is colonised, but infection seems to be blocked by a yellow fluorescent zone six weeks post-inoculation. H) After the yellow fluorescent zone, a green fluorescent tissue was observed at higher magnification to ensure no fungus colonised it. I) There is no P. aleophilum::gfp7 in the green fluorescent cell layer, but interestingly sometime some ovoid structures (highlighted by fluorescent cells) (asterisks) are accumulating in those cells. Inoc. point: inoculation point.

CSLM visualisation of wild-type *P. aleophilum* CBS 100398 six weeks post inoculation using Alexa Fluor® 488 WGA

Using Alexa Fluor® 488 WGA, hyphae or short hyphae were detected near the inoculation point at the internodal level. Fibres were especially observed to be intensively colonised in plants subjected to the *P. aleophilum* wild-type strain (Figure 5A) around the point of inoculation in comparison to the mock control (Figure 5B).

Hyphae, conidia or germinated conidia were additionally detected in bark (Figure 5C) and few in parenchymal cells (Figure 5D) and fibres (Figure 5E). The pith seemed to be sparsely colonised (Figure 5F) in comparison to mock control (Figure 5G) and few microbes, that may represent natural endophytes of cuttings, were detected in control plants (Figure 5G). A small amount of fungi and bacteria has been additionally detected in the lumen of xylem vessels of control plants but most of the samples did not reveal any hyphae in this cell layer (data not shown).

Six weeks post inoculation at the node level, hyphae were detected at the point of inoculation where a plant response was detected near this zone (Figure 6A). As for samples inoculated with *P. aleophilum*::*gfp*7, a higher fluorescence of blue, green and pink cells was observed on samples inoculated with wild-type strain of *P. aleophilum* (Figure 6A) than in the node of mock plants (Figure 6B). These zones did not cover all the inoculation point as with the use of *P. aleophilum*::*gfp*7. Parts of the inoculation point were colonised (Figure 6C), while others were not (Figure 6D). No granules reported with samples of *P. aleophilum*::*gfp*7 were recorded.

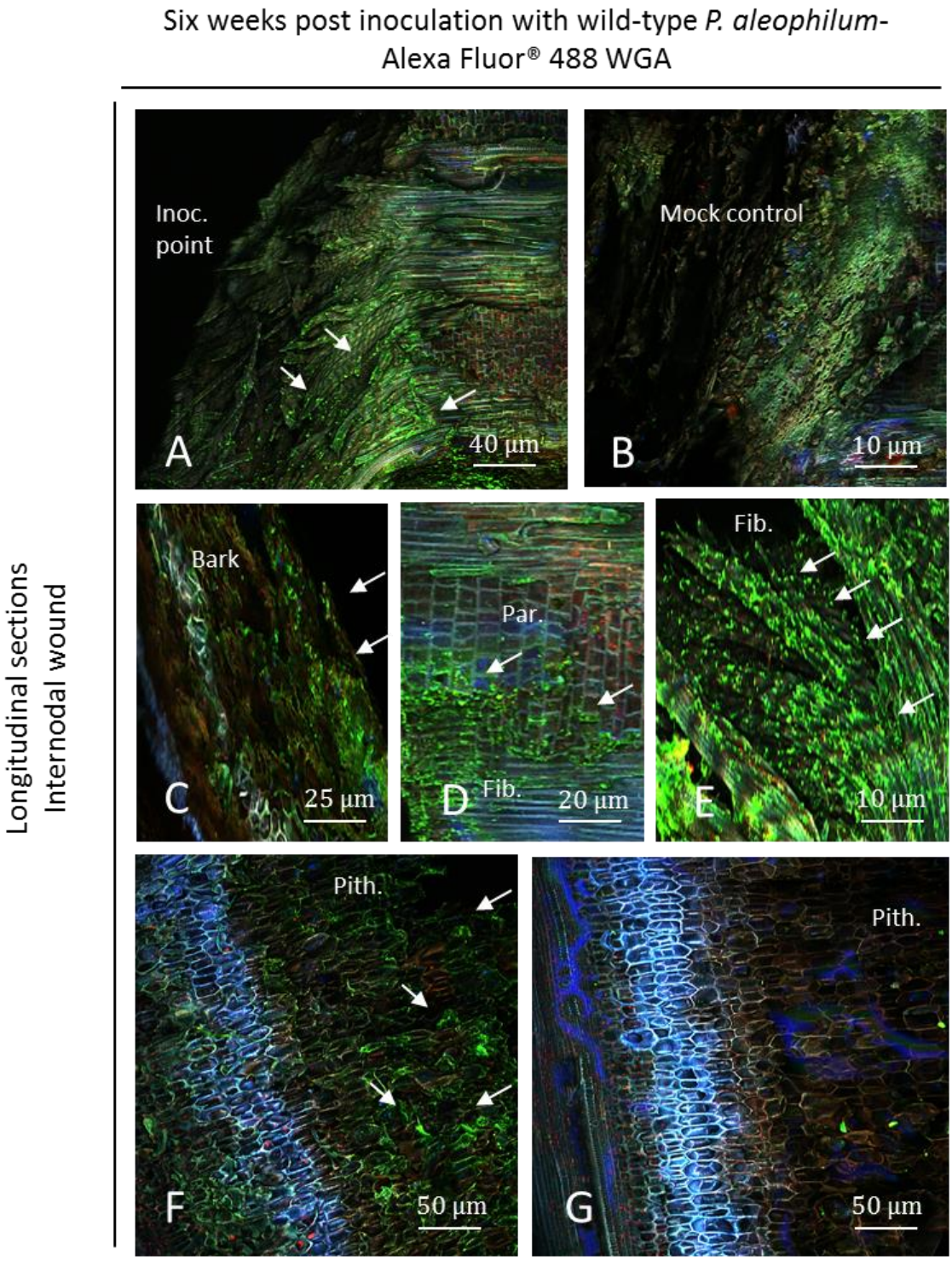


Figure 5: Observation of internodal longitudinal sections of Cabernet Sauvignon clone 15 cuttings challenged with wild-type P. aleophilum CBS 100398 (arrows) six weeks post-inoculation and stained with Alexa Fluor® 488 WGA. A) Inoculation point colonised by P. aleophilum. B) Mock control. C) Damaged bark covered with wild-type P. aleophilum. D) Parenchymal cells colonised by P. aleophilum, close to xylem fibres. E) Xylem fibres strongly colonised by wild-type P. aleophilum. F) Pith colonised by few hyphae. G) Mock control pith colonised by few natural endophytes. Fib.: fibres, Inoc. point: inoculation point, Par.: Parenchyma.

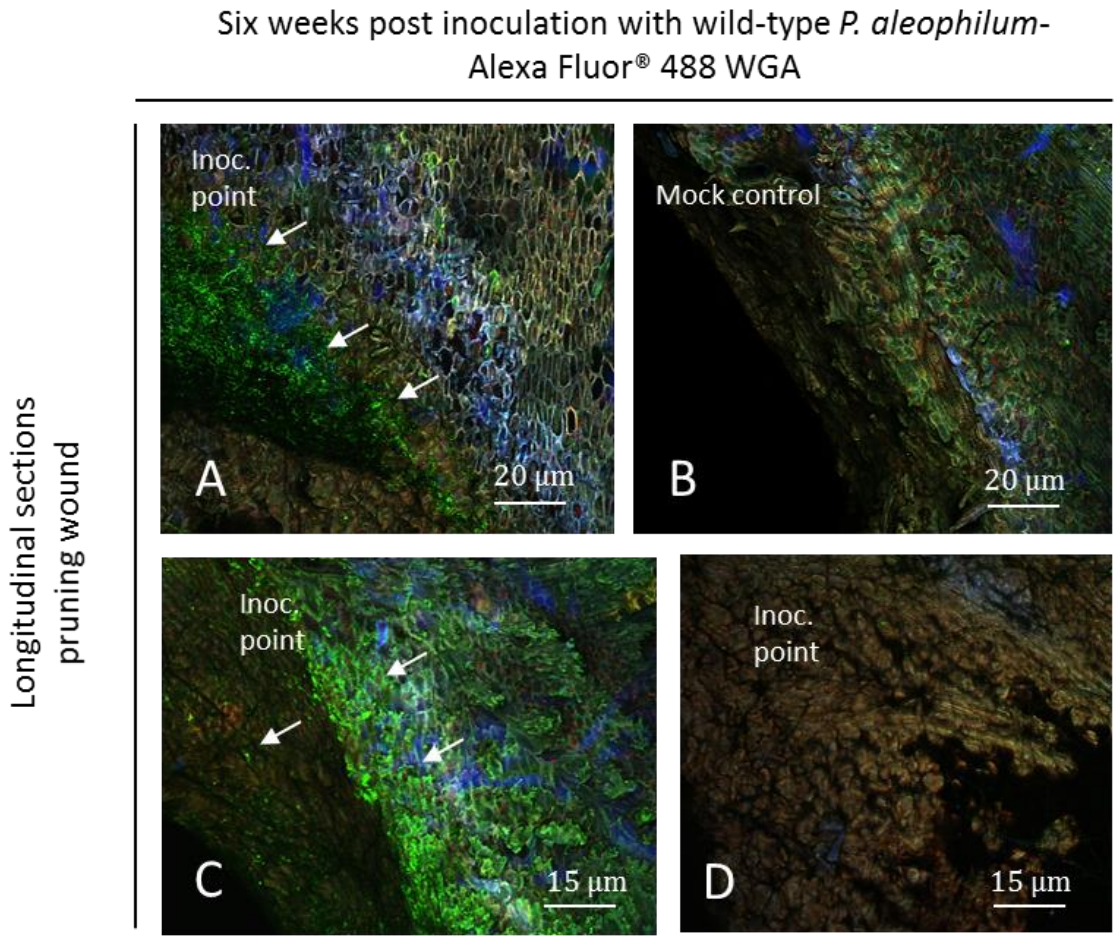


Figure 6: Observation of nodal transverse sections of Cabernet Sauvignon clone 15 cuttings challenged with wild-type P. aleophilum CBS 100398 (arrows) six weeks post-inoculation and coloured with Alexa Fluor® 488 WGA. A) Inoculation point showing P. aleophilum and a strong plant response, as indicated by blue, pink and green fluorescence. Sometimes this plant defence reaction was yellow fluorescent. B) Mock control. C-D) Magnification of zone colonized by the fungus (C) or not (D). Inoc. point: inoculation point.

CSLM microscopy of *P. aleophilum*::*gfp*7 twelve weeks post inoculation

At the internode level, the inoculation point was densely colonised with long hyphae (Figure 7A) in comparison to mock control where no hyphae were detected (Figure 7A). Hyphae were also visualised in bark (Figure 7C) and short hyphae were observed in fibres where a strong response was observed in parenchymal cells near the fibres (Figure 7D) in all the samples but not along the entire fibre zone. Fibres were colonised by short hyphae while in the xylem lumen longer hyphae were frequently observed (Figure 7E). Some xylem elements were not colonised but were observed as having strong yellow/orange or red fluorescence (data not shown, but see transversal section in Figure 7I). Hyphae passing from fibre cell layers to the xylem lumen were additionally visualised on the ones colonised (Figure 7E). In the pith and xylem fibres, long hyphae were visualised with a colonisation zone up to 8 mm up or down from the point of inoculation that was not seen for xylem elements. The pith appeared as destroyed and brown in comparison to the control treatment (Figure 7F-H). Interestingly,

some cells inside the pith were not colonised by the fungus (Figure 7F-G) and some showed different fluorescences to the ones colonised by the fungus (Figure 7F and 7G).

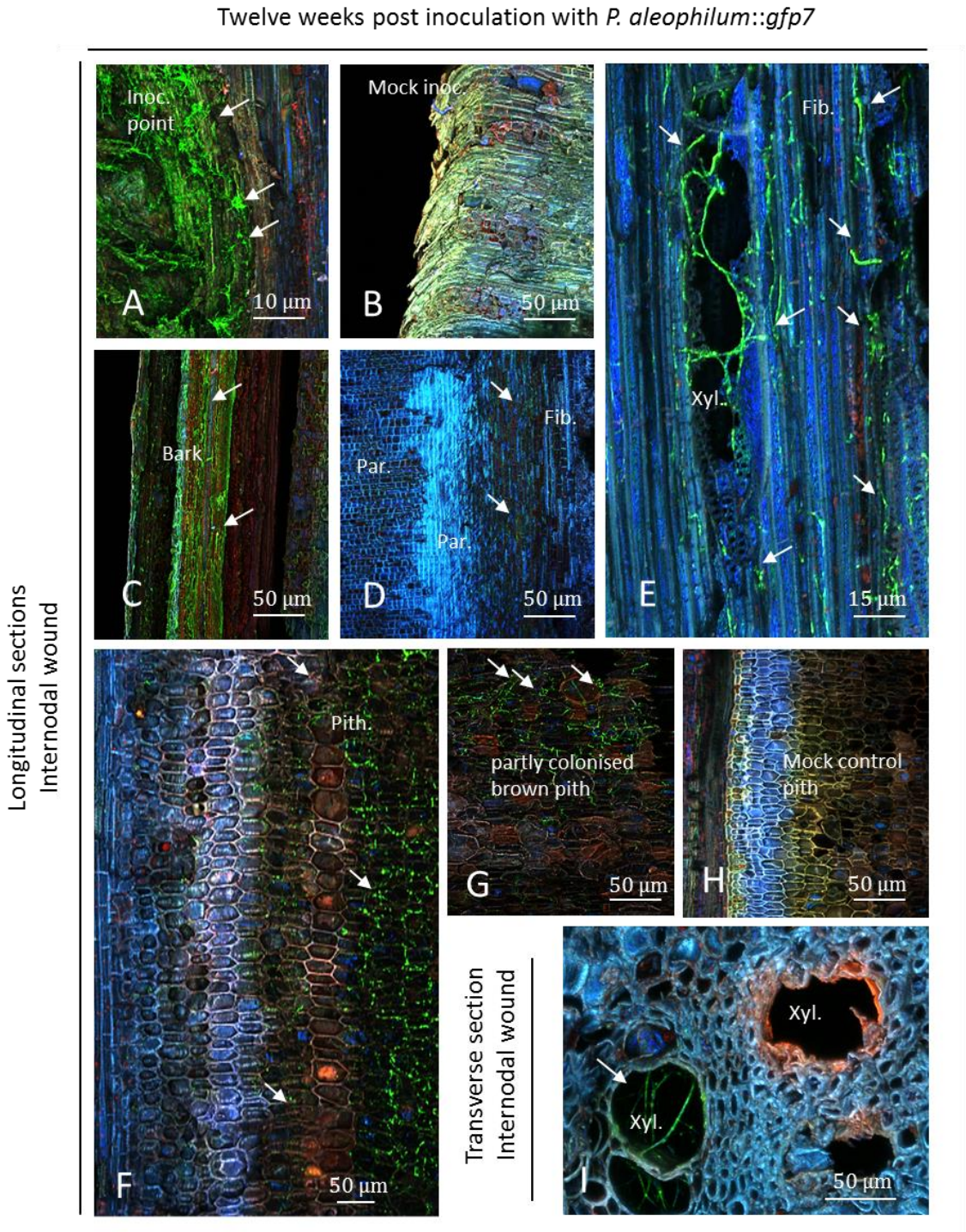


Figure 7: Observation of internodal longitudinal (A-H) and transverse (I) sections of Cabernet Sauvignon clone 15 cuttings challenged with P. aleophilum::gfp7 (arrows) twelve weeks post-inoculation. A) Inoculation point colonised by hyphae of P. aleophilum::gfp7. B) Mock control. C) Damaged bark covered with hyphae of P. aleophilum::gfp7. D) Fibres colonised by short hyphae of P. aleophilum::gfp7, with a blue autofluorescent reaction in parenchymal cell tissues next to them. E) Xylem vessel's lumen strongly colonised by P. aleophilum::gfp7 with hyphae longer than in fibres. F-G) Brown pith colonised by P. aleophilum::gfp7 hyphae with fluorescent reaction zone not colonised (see cells not colonised in F). H) Pith control. I) P. aleophilum::gfp7 in metaxylem and some xylem elements not colonised but with orange/red fluorescence (strong yellow fluorescence was also recorded). Fib.: fibres, Inoc. point: inoculation point, Par.: Parenchyma, Xyl.: xylem.

These cells were blue, pink or red fluorescent. Inside transversal sections the xylem lumen was colonised (Figure 7I). Destroyed xylem vessels were not colonised by the fungus and an orange/red fluorescence was recorded in these xylem vessels as described before (Figure 7I).

At the node level, and at the point of inoculation, plant responses and a necrotic zone were observed for plants inoculated with *P. aleophilum*::*gfp*7 (Figure 8A). Control plants presented similar responses adjacent to a necrotic zone (Figure 8B).

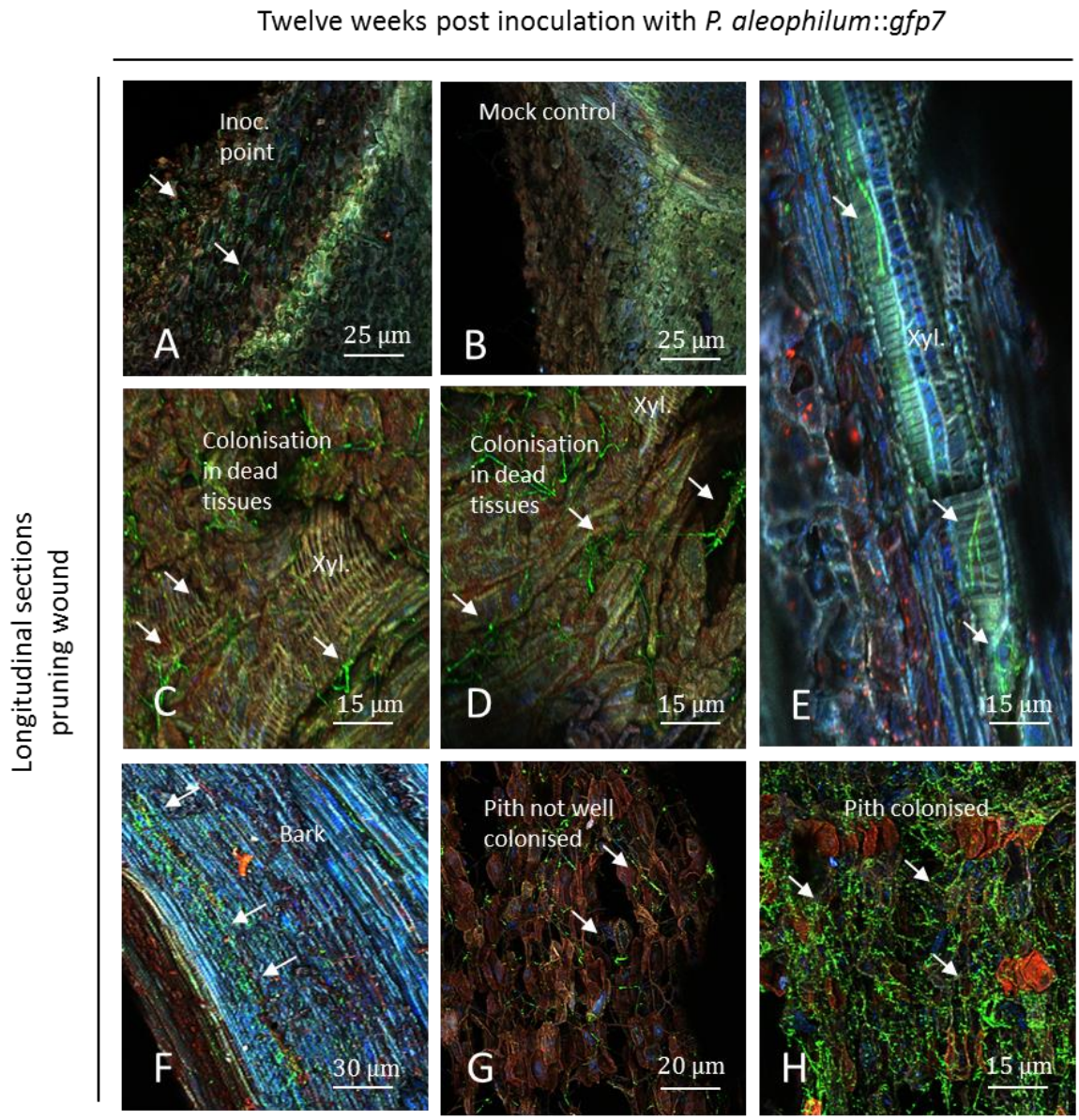


Figure 8: Observation of nodal transverse sections of Cabernet Sauvignon clone 15 cuttings challenged with P. aleophilum::gfp7 (arrows) twelve weeks post-inoculation. A) Inoculation point showing a very low amount of P. aleophilum::gfp7 (arrows) and a strong plant response, appearing yellow and brighter than in control plants (B). C-D) Colonisation of dead tissues by P. aleophilum::gfp7 in fibres and xylem elements. E) Hyphae of P. aleophilum::gfp7 in xylem vessel. F) Bark colonised by P. aleophilum::gfp7. G-H) Brown pith sparsely or densely colonised. Inoc. point: inoculation point, Xyl.: xylem.

Less colonisation was recorded in comparison to the internodal inoculation twelve weeks post inoculation. Colonisation of fibres and xylem elements was observed in dead tissues (Figure 8C-D). Hyphae were also observed inside the lumen of xylem of living plant parts, but always near the point of inoculation (Figure 8E). Bark was found to be colonised by short hyphae (Figure 8F). In the pith, some parts were detected as brown and not well colonised or alternatively densely colonised (Figure 8G-H). This pith was colonised 8 mm above and below the point of inoculation.

CSLM visualisation of wild-type *P. aleophilum* CBS 100398 twelve weeks post inoculation using Alexa Fluor® 488 WGA

At the internode level, the inoculation point was densely colonised with long hyphae (Figure 9A) as for samples with *P. aleophilum*::*gfp*7 in contrast to control plants where no green fluorescent cells were observed (Figure 9B). Near the inoculation point, necrosis was visualised and the presence of fungi was observed in parenchymal cells as well as at the fibre level (Figure 9C). Fibres were heavily colonised (Figure 9D). Hyphae were detected in the pith, which appeared brown, although some plant cells were not colonised (Figure 9E). Control piths were less brown but also contained few microbes (hyphae and bacteria of endophytic nature) (Figure 9F). Also in fibres, hyphae and/or bacteria were detected in control plants as well as in xylem elements (Figure 9F) but many less than in inoculated plants. In samples inoculated with wild-type strain of *P. aleophilum*, pith parts were strongly colonised and appeared in brown colour with hyphae longer than in other tissues (Figure 9G). In tissues of the bark, hyphae were also visualised (Figure 9H). As for *P. aleophilum*::*gfp*7, pith and fibres were colonised up to 8 mm from the point of inoculation, whereas colonisation of xylem elements lagged behind. In most of the xylem vessels, a plant response was observed (Figure 9I-J). Tyloses were frequently seen and cell-walls of the xylem elements showed yellow or sometimes orange fluorescence (Figure 9I-J). In these xylem elements, hyphae were observed (Figure 9I-J), but not in every xylem element. Xylem vessels in mock treated plant also presented tyloses (data not shown).

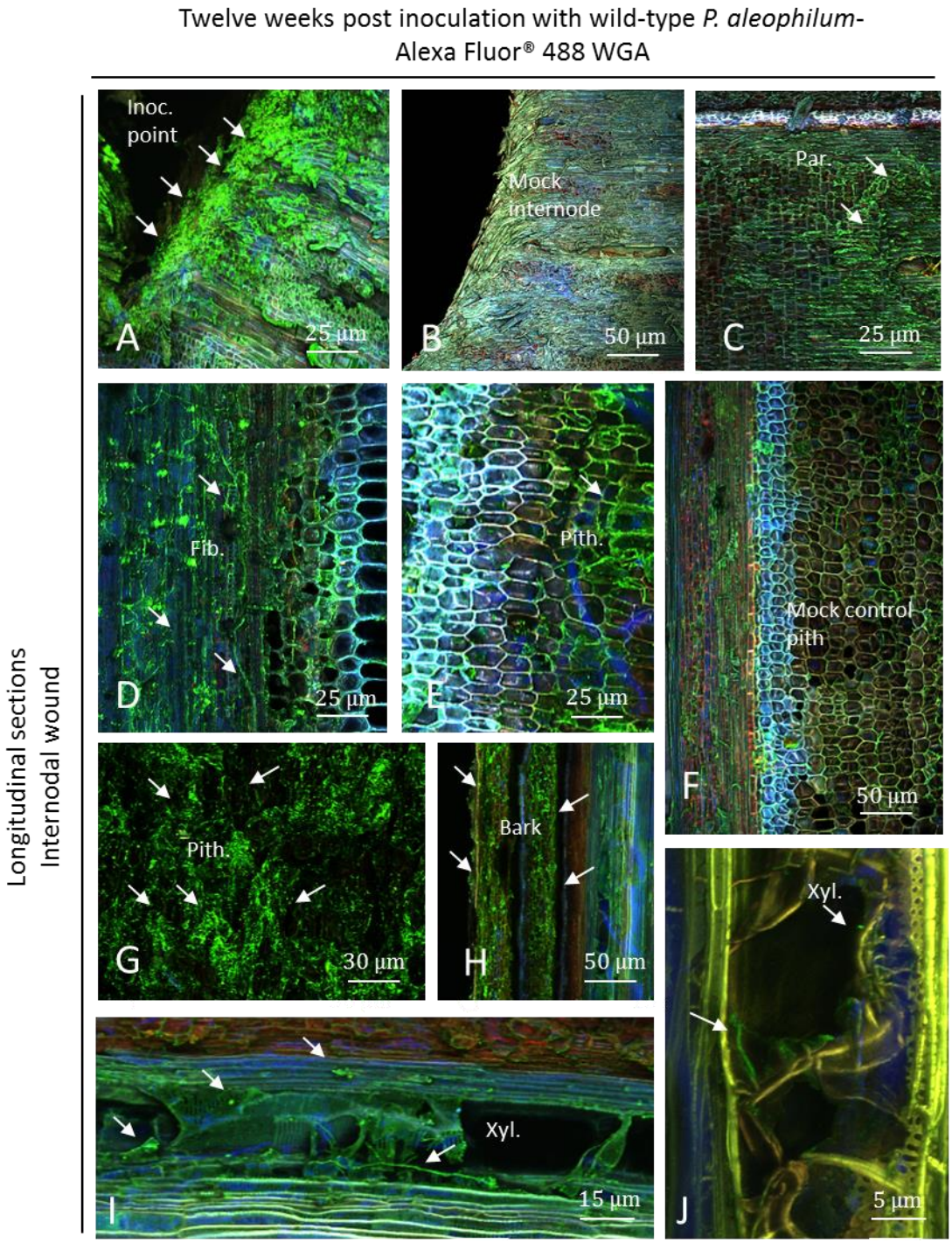


Figure 9: Observation of internodal longitudinal sections of Cabernet Sauvignon clone 15 cuttings challenged with wild-type P. aleophilum CBS 100398 (arrows) twelve weeks post-inoculation and stained with Alexa Fluor® 488 WGA. A) Inoculation point colonised by P. aleophilum. B) Mock control. C) Presence of fungi in parenchymal cells surrounding a necrosis point. D) Fibres colonised by P. aleophilum. E) Brown pith colonised by P. aleophilum. Some pith cells were not colonised but exhibit strong fluorescence. F) Control pith containing few hyphae of endophytic nature as well as in fibres and in the xylem zone. G) Brown pith strongly colonised by P. aleophilum. H) Bark colonised. I-J) Hyphae in xylem vessels, where tyloses have been also detected, with differences of fluorescence of the cell-walls. Fib.: fibres, Inoc. point: inoculation point, Par.: Parenchyma, Xyl.: xylem.

At the node level, the plant response was less intense twelve weeks post inoculation than six weeks post inoculation (Figure 10A). The plant responded similarly to *P. aleophilum* CBS 100398 treatment and mock treatment twelve weeks post inoculation (Figure 10A-B). Hyphae were observed at node level (Figure 10C) with less colonisation than at the internode. Some dead tissues were observed as containing hyphae (Figure 10D) and xylem elements were colonised by hyphae (Figure 10E). Green fluorescent hyphae were also detected as shorter hyphae in bark near the point of inoculation (Figure 10F). The pith was brown and either sparsely (Figure 10G) or heavily colonised (Figure 10H). Few hyphae and bacteria were recorded in control plants using Alexa Fluor® 488 WGA.

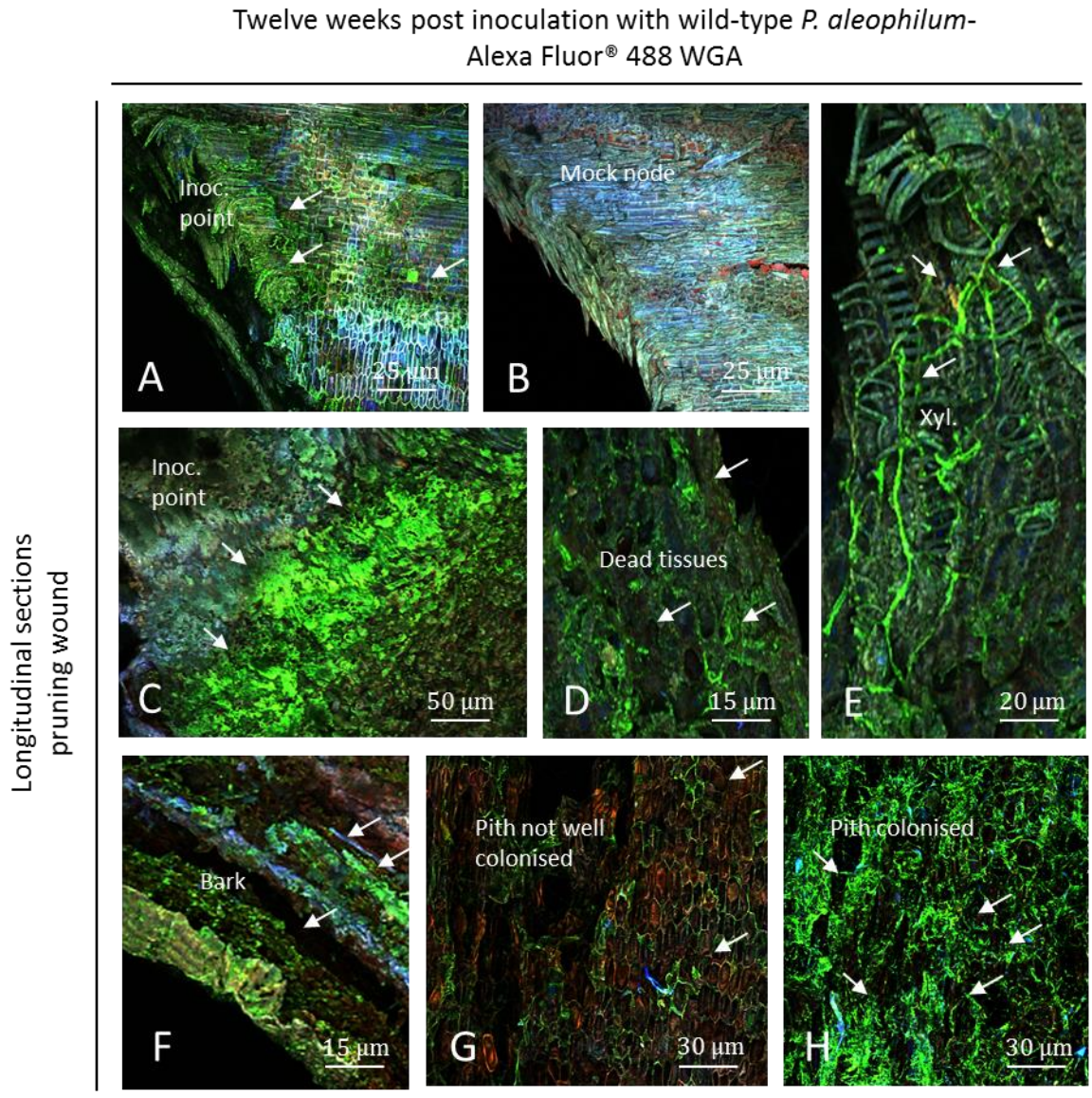


Figure 10: Observation of nodal transverse sections of Cabernet Sauvignon clone 15 cuttings challenged with wild-type P. aleophilum CBS 100398 (arrows) twelve weeks post-inoculation and coloured with Alexa Fluor® 488 WGA. A) Inoculation point showing a very low amount of P. aleophilum (arrows) and a strong plant response, brighter than in control plants (B) and yellow. C) Close view of inoculation point showing colonisation of green fluorescent fungi. D-E) colonisation of dead tissues by hyphae in parenchymal cells, fibres and xylem elements. F) Bark colonised by P. aleophilum. G-H) Brown pith sparsely or densely colonised. Inoc. point: inoculation point, Xyl.: xylem.

Discussion

P. aleophilum is considered as a pioneer in esca pathology. Understanding early events of trunk colonisation by these agents requires biomarkers to specifically localise a microorganism in its ecological niche. GFP-modified organisms are routinely used under laboratory conditions [22,26,29]. In this study, we analysed the behaviour of one strain of *P. aleophilum* marked with the *gfp* gene and further compared it to a wild-type strain of *P. aleophilum* using Alexa Fluor® 488 WGA probe and mock treated plants.

This probe preferentially binds to the chitin of all fungal species, and thus does not only report the presence of *P. aleophilum* specifically, but was also required to compare wild-type strain and *gfp* marked strain in planta. On plants inoculated with *P. aleophilum* or control plants stained with Alexa Fluor® 488 WGA, we detected natural endophytes. This is not surprising as cuttings were not sterile and it is well known that grapevine plants host natural endophytic microbes such as bacteria and fungi (natural microbes described in cuttings of [30]; and microflora inside twigs from the field [28,31]. WGA can detect fungi as well as gram-positive bacteria, archaea and other microbes (protozoa) as this lectin binds to N-acetyl-D-glucosamine and sialic acid [32–34]. Cuttings were treated, however, with fungicide and with ethanol before use and less endophytes were seen in cuttings in comparison to what is known with twigs in the field (see for instance pictures and suppl. information in [28]. Indeed, only a small amount of natural endophytes were detected. This highlights the need of a *gfp* transformant to study the colonisation of grapevine by *P. aleophilum*. This also implies that most of the Alexa Fluor® 488 WGA signal observed in plant inoculated with the wild strain reported the presence of *P. aleophilum*. The colonisation of both wild type and transformed strains is thus comparable and the colonisation was similar in all different modalities tested: six weeks or twelve weeks post inoculation, in the internode or the node of grapevine cuttings. The only exception is that in some plants at 6 weeks post inoculation we detected some ovoid granules in the case of *P. aleophilum*::*gfp*7 but not with the use of wild-type *P. aleophilum*. It remains speculative to discuss as to what these materials can be, and it may be due to natural endophytes in some specific plants, as material was harvested from the vineyard and only few plants showed this response. For this reason, the colonisation of *P. aleophilum* is discussed without distinction of the transformed or wild-type strains.

This study compares the early colonisation behaviour of *P. aleophilum* in two different plant tissues six and twelve weeks post inoculation. Cuttings from Cabernet Sauvignon clone 15 were inoculated at the internodal and nodal regions and differences were recorded regarding fungal colonisation. The inoculation was efficient because the wounded region was covered with hyphae in comparison to control plants six and twelve weeks post-inoculation, for both internodal and nodal inoculation. In addition, symptoms were observed in plants inoculated with both strains, transformed and wild-type, twelve weeks post inoculation as the wood of

inoculated plants presented brownish discolorations. The inoculation of a plug of hyphae is probably not comparable to natural conditions, but was necessary for this fundamental model designed for understanding early colonisation events by *P. aleophilum* in the trunk of young cuttings of Cabernet Sauvignon, and this pathosystem allows us to observe microscopic symptoms.

P. aleophilum infection from plant to plant could occur in vineyards because of conidia dispersal [9]. Nevertheless, infection of healthy wood may also originate from the bark next to the injury. Indeed, *P. aleophilum* can survive 12 weeks on the bark and still remain active under laboratory conditions. Consequently, both conidia and hyphae inocula should be used in a reductionist pathosystem designed to study wood diseases.

Early colonisation of grapevine trunk tissues (six and twelve weeks post inoculation) seems to be more successful when inoculating *P. aleophilum* in the internode than in the node after cutting off a branch. In the internode, the fungus colonised, six weeks post inoculation, the inoculation point and is limited to xylem fibres, pith and the bark, with a stronger colonisation of fibres compared to other tissues. The parenchyma was also colonised but to a smaller extent than the xylem fibres, and very few numbers of hyphae could be observed inside xylem vessels. At the internode level, pith (appearing as brown) and xylem fibres were strongly colonised twelve weeks post inoculation by *P. aleophilum*. The bark was also colonised. Colonisation of the lumen of xylem vessels was additionally detected but the presence of tyloses blocked the progression of the fungus. The formation of tyloses has also been observed in mock treated plants. This is not surprising because vessel obstruction, involved in the compartmentalization of wood decays, cannot be separated from the plant response to wounding damage in our model [35–37].

Interestingly the fungus spread up to 8 mm from the inoculation site along the trunk. In the upper wood section, *P. aleophilum* was found in the pith, the parenchyma and xylem fibres as well as bark but only a low signal was detected in xylem vessels in comparison to the point of inoculation. The location of *P. aleophilum* inoculated in young cuttings is similar to observations of the niches revealed using electron microscope made by Valtaud et al. [17] and with a non-*gfp* transformant. Inoculation of single-bud in-vitro plants growing aseptically was shown to result in the colonisation of all tissues forming the stem or roots and even leaves, a fact that is not considered possible under field conditions [15]. Using a FITC-WGA assay, Fleurat-Lessard et al. [18] visualised the fungus one year after inoculation in several parts of the trunk of the infected cuttings of cv. Ugni blanc, mainly inside xylem vessels and fibres, but also in protoxylem, pith and rays. Comparatively, using an FITC-labelled serological approach they presented a similar localisation of the hyphae in the lumen of xylem vessels, vessel-associated cells, fibres and rays. Remarkably Fleurat-Lessard et al. [18] showed that only cell-walls of xylem fibres were damaged by *P. aleophilum*. The wood fibres thus seem to be an

important tissue for the early events in *P. aleophilum*-grapevine interaction. Less active wood fibres, next to xylem vessels, may constitute a lignified shelter for *P. aleophilum* although the fungus can subsequently reach the xylem lumen.

At the node level, the fungus was restricted at the point of inoculation six weeks post inoculation. This tissue responded strongly to treatments, nevertheless *P. aleophilum* was detected in bark, dead tissues as well as inside the pith, xylem fibres and xylem vessels twelve weeks post inoculation. The progression of the fungus inside plants was recorded up to 8 mm from the point of infection twelve weeks post inoculations. Symptoms of wood decay were also recorded.

Different plant responses were recorded during progression of the fungus. Grapevine wood response was observed in both nodal and internodal tissues. Plant responses in the node were higher than in the internode. In the node, and especially in transversal sections, an intense reaction zone was visible six weeks post inoculation in plants inoculated with *P. aleophilum* and mock treated plants. This response can be considered as two components: wood response to wounding observed in the mocks, and wood response to *P. aleophilum*. Indeed, *P. aleophilum* induced a blue, green and pink fluorescence more intense than in mocks six weeks post inoculation. This difference of wood response in the node disappeared twelve weeks post inoculation. The reaction zone was similar in inoculated plants and mock plants. Consequently grapevine response in the node varied according to the time post treatment and it seems correlated to the presence of *P. aleophilum* six weeks post inoculation and only related to wound healing twelve weeks after inoculation.

Plant responses in the internode were not visible six weeks post inoculation. Twelve weeks post inoculation a fluorescent plant response was visualised in different tissues such as pith, parenchymal cells near fibres and in xylem vessels. Interestingly, those fluorescent cells were not colonised by the fungus or rarely colonised by only a small number of hyphae. This suggests that plant responses may prevent the colonisation of some cells by *P. aleophilum* without hampering a colonisation of the plant up to 8 mm from the inoculation point twelve weeks post inoculation. We observed that the fungus reaches xylem vessels following fibre colonisation, and progresses slowly inside plants using fibres and pith that are degraded. Xylem colonisation is blocked by tylose formation. Defence reactions following inoculation of *P. aleophilum* have been well documented previously (see [38,39]) and correspond to what we have seen in this study, excepted that we observed plant responses under different wavelength of fluorescence.

The macroscopic response of trunk tissues to fungal pathogens is considered as general and nonspecific [40,41], but this question has to be addressed molecularly to reveal whether the perception exhibits specificity or not. Indeed our study suggests for the first time that trunk tissues may respond particularly to an esca-associated agent six weeks post inoculation in the

node. This response seems to be different than the response observed in plants damaged six weeks post inoculation but not twelve weeks post inoculation.

In this work, we focused on monitoring the colonisation by *P. aleophilum* and revealed - by using both a *gfp* mutant as well as the wild type strain - that *P. aleophilum* colonises more efficiently when entering the plant at the internode than at the node. However, so far *gfp* marked strain have not been applied for studying the colonisation behaviour of *P. aleophilum* specifically. Use of *gfp* marked strain has been done with another associated esca fungus *P. chlamydospora* [24] using *Vitis vinifera* L. 'Montepulciano', 'Verdicchio', 'Sangiovese', 'Biancame', and 'Cabernet Sauvignon'; and the grapevine rootstocks 'Kober 5BB', 'SO4', '420A', '1103P', and V. rupestris. The expression of the Pch-sGFP71 transformed line was localised in the xylem area, primarily around the vessels. The use of a DsRed-labelled *P. chlamydospora* has also confirmed a preference for the xylem compared to the pith of Cabernet-Sauvignon and Sauvignon Blanc cuttings [23]. However, no report of *gfp* transformed *P. aleophilum* and its study of colonisation has been previously done.

In our study, we showed that the higher colonisation of the internode was linked to the colonisation of xylem fibres prior to the later colonisation of xylem vessels and that bark and pith contributes to the progression of the fungus. Interestingly the node, which was less colonised compared to the internode, was the tissue responding the most to treatments. Grapevine wood responds to wounding and may also provide a particular response to *P. aleophilum*. The nature of these responses and its capacity to protect the plant will be an important focus for future studies. A better understanding of esca-associated fungal colonisation in grapevine wood tissues will be gained through the full appreciation and elucidation of the associated complex pathosystem, which is essential in order to develop alternative strategies to control the disease.

Acknowledgements

The authors are grateful to French ministry, Region Midi-Pyrénées (project n°12050499), as well as European Cost action FA1303 and to Dr. Brian Murphy (Trinity College Dublin, Ireland) for English correction of the manuscript.

References

1. Bertsch C, Ramírez-Suero M, Magnin-Robert M, Larignon P, Chong J, et al. (2013) Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. Plant Pathol 62: 243–265. doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02674.x

2. Urbez-Torres JR (2011) The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. Phytopathol Mediterr 50: S5–S45. doi: org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-9316

3. 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-La Défense des végétaux 651: 31–35.

4. 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. doi: 10.1007/s10658-009-9481-8

5. Iriti M, Faoro F (2008) Ancient plant diseases in Roman Age. Acta Phytopathol Entomol Hungarica 43: 15–21. doi: 10.1556/APhyt.43.2008.1.2

6. 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. doi: 10.1094/PDIS.1999.83.5.404

7. Larignon P, Fontaine F, Farine S, Clément C, Bertsch C (2009) Esca and Black Dead Arm: two major actors of grapevine trunk diseases. C R Biol 332: 765–783. doi: 10.1016/j.crvi.2009.05.005

8. Lecomte P, Darrieutort D, Liminana J-M, Comont G, Muruamendiaraz A, et al. (2012) New insights into esca of grapevine: The development of foliar symptoms and their association with xylem discoloration. Plant Dis 96: 924–934. doi: 10.1094/PDIS-09-11-0776-RE

9. Rooney-Latham S, Eskalen A, Gubler WD (2005) Occurrence of *Togninia minima* perithecia in esca-affected vineyards in California. Plant Dis 89: 867–871. doi: 10.1094/PD-89-0867

10. 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. doi: 10.1094/PDIS-01-11-0025

11. Halleen F, Crous PW, Petrini O (2003) Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. Australas Plant Pathol 32: 47–52. doi: 10.1071/AP02062

12. Crous PW, Gams W (2000) *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. Phytopathol Mediterr: 112–118. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-1530

13. Crous PW, Gams W, Wingfield MJ, van Wyk PS (1996) *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections. Mycologia 88: 786.

14. Úrbez-Torres JR, Haag P, Bowen P, O'Gorman DT (2014) Grapevine trunk diseases in British Columbia: incidence and characterization of the fungal pathogens associated with esca and Petri diseases of grapevine. Plant Dis 98: 469–482. doi: 10.1094/pdis-05-13-0523-re

15. Feliciano AJ, Gubler WD (2001) Histological investigations on infection of grape roots and shoots by *Phaeoacremonium* spp . Phytopathol Mediterr: 387–393. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-1623

16. Adalat K, Whiting C, Rooney S, Gubler W (2000) Pathogenicity of three species of *Phaeoacremonium* spp. on grapevine in California. Phytopathol Mediterr 39: 92–99. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-1550

17. Valtaud C, Larignon P, Roblin G, Fleurat-Lessard P (2009) Developmental and ultrastructural features of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* in relation to xylem degradation in esca disease of the grapevine. J Plant Pathol 91: 37–51. doi: 10.4454/jpp.v91i1.622

18. Fleurat-Lessard P, Luini E, Berjeaud J-M, Roblin G (2014) Immunological detection of *Phaeoacremonium aleophilum*, a fungal pathogen found in esca disease. Eur J Plant Pathol 139: 137–150. doi: 10.1007/s10658-013-0372-7

19. Pouzoulet J, Jacques A, Besson X, Dayde J, Mailhac N (2013) Histopathological study of response of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon to bark and wood injury with and without inoculation by *Phaeomoniella chlamydospora*. Phytopathol Mediterr 52: 313–323. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-12581

20. Troccoli L, Calamassi R, Mori B, Mugnai L, Surico G (2001) *Phaeomoniella chlamydospora*-grapevine interaction: histochemical reactions to fungal infection. Phytopathol Mediterr 40: 400–406. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-1610

21. Bradshaw R, Duan G, Long PG (2005) Transformation of fungal grapevine trunk disease pathogens with the Green Fluorescent Protein gene. Phytopathol Mediterr 44: 162–168. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-1792

22. McLean T, Fourie PH, McLeod A (2009) Reporter gene transformation of the trunk disease

pathogen *Phaeomoniella chlamydospora* and biological control agent *Trichoderma harzianum*. Australas Plant Pathol 38: 153–167. doi: 10.1071/AP08090

23. Mutawila C, Fourie PH, Halleen F, Mostert L (2011) Histo-pathology study of the growth of *Trichoderma harzianum*, *Phaeomoniella chlamydospora* and *Eutypa lata* on grapevine pruning wounds. Phytopathol Mediterr 50: S46–S60. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-8643

24. Landi L, Murolo S, Romanazzi G (2012) Colonization of *Vitis* spp. wood by sGFP-transformed *Phaeomoniella chlamydospora*, a tracheomycotic fungus involved in esca disease. Phytopathology 102: 290–297. doi: 10.1094/PHYTO-06-11-0165

25. Gorfer M, Klaubauf S, Bandian D, Strauss J (2007) *Cadophora finlandia* and *Phialocephala fortinii*: *Agrobacterium*-mediated transformation and functional GFP expression. Mycol Res 111: 850–855. doi: 10.1016/j.mycres.2007.05.002

26. Lorang JM, Tuori RP, Martinez JP, Sawyer TL, Redman RS, et al. (2001) Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. Appl Environ Microbiol 67: 1987–1994. doi: 10.1128/AEM.67.5.1987-1994.2001

27. Pontini S, Fleurat-Lessard P, Béré E, Berjeaud J-M, Roblin G (2014) Impact of temperature variations on toxic effects of the polypeptides secreted by *Phaeoacremonium aleophilum*. Physiol Mol Plant Pathol 87: 51–58. doi: 10.1016/j.pmpp.2014.06.002

28. Campisano A, Ometto L, Compant S, Pancher M, Antonielli L, et al. (2014) Interkingdom transfer of the acne-causing agent, *Propionibacterium acnes*, from human to grapevine. Mol Biol Evol 31: 1059–1065. doi: 10.1093/molbev/msu075

29. Leveau JHJ, Lindow SE (2002) Bioreporters in microbial ecology. Curr Opin Microbiol 5: 259–265. doi: 10.1016/S1369-5274(02)00321-1

30. Compant S, Kaplan HH, Sessitsch A, Nowak J, Barka EA, et al. (2008) Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. Fems Microbiol Ecol 63: 84–93. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00410.x

31. Pancher M, Ceol M, Corneo PE, Longa CMO, Yousaf S, et al. (2012) Fungal endophytic communities in grapevines (*Vitis vinifera* L.) respond to crop management. Appl Environ Microbiol 78: 4308–4317. doi: 10.1128/AEM.07655-11

32. Robin JB, Chan R, Rao NA, Sharma S, Srinivasan M (1989) Fluorescein-conjugated lectin visualization of fungi and acanthamoebae in infectious keratitis. Ophthalmology 96: 1198–1202. doi:10.1016/S0161-6420(89)32751-5

33. Sizemore RK, Caldwell JJ, Kendrick AS (1990) Alternate gram staining technique using a fluorescent lectin. Appl Envir Microbiol 56: 2245–2247.

34. Fife DJ, Bruhn DF, Miller KS, Stoner DL (2000) Evaluation of a fluorescent lectin-based staining technique for some acidophilic mining bacteria. Appl Environ Microbiol 66: 2208–2210. doi: 10.1128/AEM.66.5.2208-2210.2000

35. Shigo AL, Marx HG (1977) Compartmentalization of decay in trees. Sci Am 252: 73.

36. Tippett J (1981) Barrier zone formation: a mechanism of tree defense against vascular pathogens. IAWA Bull 2: 2–7.

37. Pearce RB (2000) Decay development and its restriction in trees. J Arboric 26: 1–11.

38. Del Rio J, Gonzalez A, Fuster MD, Botia JM, Gomez P, et al. (2001) Tylose formation and changes in phenolic compounds of grape roots infected with *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* species. Phytopathol Mediterr 40: 394–399. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-1644

39. Río JA del, Gómez P, Báidez A, Fuster MD, Ortuño A, et al. (2004) Phenolic compounds have a role in the defence mechanism protecting grapevine against the fungi involved in Petri disease. Phytopathol Mediterr 43: 87–94. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-1736

40. Blanchette RA, Biggs AR (1992) Defense mechanisms of woody plants against fungi. Berlin: Springer-Verlag. 458 p.

41. Pearce RB (1996) Antimicrobial defences in the wood of living trees. New Phytol 132: 203–233. doi: 10.1111/j.1469-8137.1996.tb01842.x

Phaeoacremonium aleophilum CBS 100398 a été transformé à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens* afin d'obtenir une souche exprimant le gène codant la protéine GFP. Parmi les différents transformants, *P. aleophilum*::*gfp7* a été retenu afin de l'inoculer dans des boutures de Cabernet Sauvignon. L'inoculation a été effectuée dans deux types de tissus différents : au niveau de l'entre nœud de la bouture ainsi qu'au niveau de la plaie de taille d'une branche nouvellement formée. La colonisation de ces tissus a été observée 6 et 12 semaines après inoculation. La colonisation de la souche exprimant la GFP a été comparée avec la colonisation de la souche sauvage marquée *in situ* avec la sonde florescence Alexia Fluor® 488 WGA, avec des plantes inoculées avec du milieu stérile et avec des témoins non traités. La souche *P. aleophilum*::*gfp7* et la souche sauvage ont colonisé le bois de la vigne de manière similaire 6 et 12 semaines après inoculation. Les témoins non traités ont présenté une flore endophytique marquée avec la sonde Alexia Fluor® 488 WGA. Les tissus des témoins non traités étaient faiblement colonisés par rapport aux plantes inoculées.

Phaeoacremonium aleophilum s'est mieux établi dans la blessure en modèle entre-nœud en comparaison avec le modèle plaie de taille 6 semaines après traitement. La colonisation la plus importante a été observée dans les fibres adjacentes aux vaisseaux du xylème. Très peu de mycélium a été détecté dans les vaisseaux de xylème, le parenchyme ou la moelle à ce temps d'observation. La moelle, les vaisseaux et les fibres de xylèmes ont été envahis de manière importante 12 semaines après inoculation. Les vaisseaux de xylème atteints par *P. aleophilum*::*gfp7* ont présenté des tyloses bloquant la progression du champignon. Cette progression a été observée jusqu'à 8 mm au-dessus du point d'inoculation. A ce niveau les fibres et la moelle étaient fortement colonisées, à la différence des vaisseaux de xylème qui présentaient peu de signal GFP. Les fibres de xylèmes seraient donc le tissu impliqué dans les évènements précoces de la colonisation de *P. aleophilum* au niveau de l'entre nœud du bois de la vigne. *P. aleophilum* n'a pas colonisé la blessure type plaie de taille 6 semaines après inoculation. Le mycélium était confronté à une forte réaction de la plante. Néanmoins la colonisation a été observée au niveau de la plaie de taille 12 semaines après inoculation. Une réaction des tissus a été visualisée. Cependant l'intensité de cette réponse était plus faible que 6 semaines auparavant. Il existerait donc une réponse locale du bois de la vigne. Cette réponse serait spécifique à la présence de *P. aleophilum* 6 semaines après inoculation et générale au pathogène ou à la blessure 12 semaines après traitement.

1.2 LA COLONISATION DU BOIS DE *VITIS VINIFERA* L. PAR *PHAEOMONIELLA CHLAMYDOSPORA*

1.2.1 Transformation de *Phaeomoniella chlamydospora*

Phaeomoniella chlamydospora CBS 239.74 a été transformé selon le même protocole que *P. aleophilum*. Cinq transformants ont été isolés sur milieu sélectif (Figure 23).

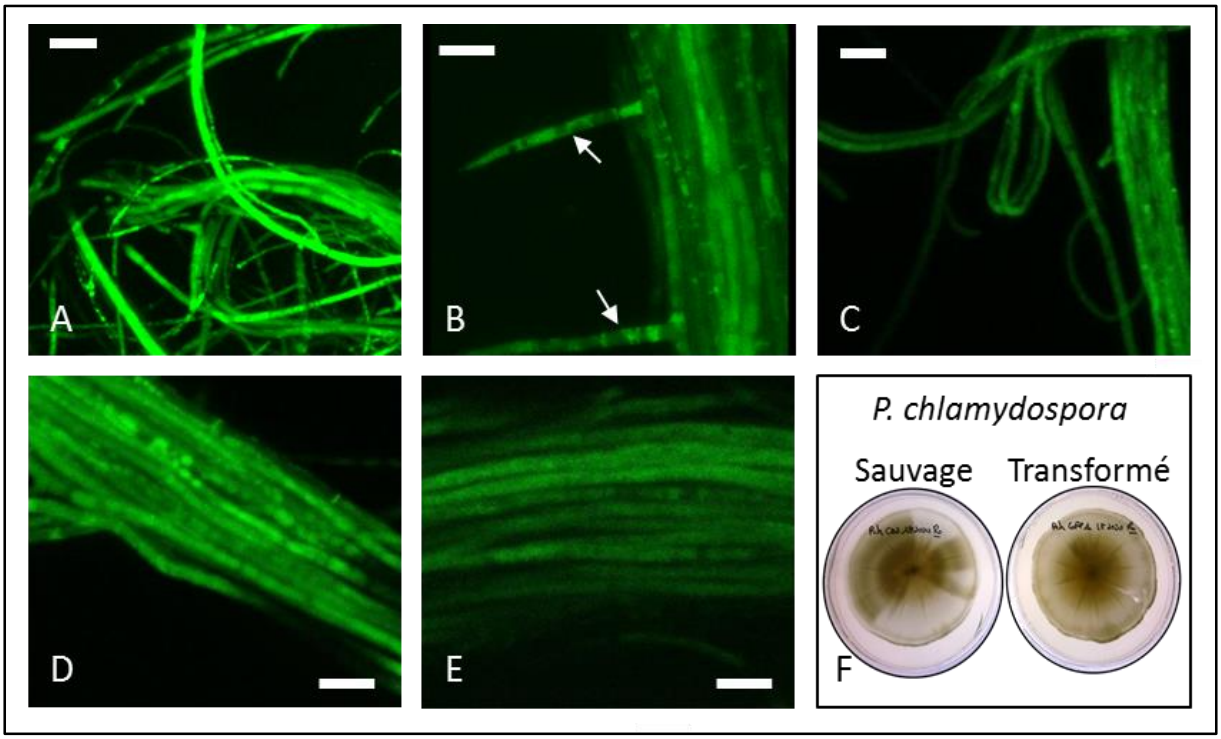


Figure 23 Photographies de P. chlamydospora::gfp à partir de cultures sur milieu PDA. Cinq transformants (A : P. chlamydospora::gfp1 ; B :gfp2 ; C :gfp3 ; D :gfp4 ; E :gfp5) présentant des fluorescences d'intensités différentes. F) Développement de P. chlamydospora::gfp1 par rapport à la souche sauvage sur boites de Petri âgées de deux mois. Barre d'échelle = 5 µm.

Le mycélium de *P. chlamydospora* provenant de culture sur boite apparaissait compact et formé par l'accumulation d'hyphes parallèles (Figure 23 A-E). Les ramifications ont rarement été observées (Figure 23 B). Cette observation semble cohérente avec l'apparence du mycélium sur boite. La croissance de *P. chlamydospora* est lente, sans propagation rapide de mycélium dédié à la colonisation en bordure du champignon. Aucune spore n'a été observée au microscope. La transformation affecterait donc la sporulation. La fluorescence la plus intense (Figure 23 A-E) a été observée chez la souche *P. chlamydospora*::*gfp1* (Figure 23 A). Cette souche a été retenue pour l'observation de la colonisation de cette espèce dans le bois de la vigne. Aucune différence de développement n'a été perceptible entre *P. chlamydospora*::*gfp1* et la souche sauvage deux mois après ensemencement sur milieu PDA (Figure 23 F).

1.2.2 Colonisation de *Phaeomoniella chlamydospora*::*gfp1* 12 semaines après inoculation

La colonisation de *Phaeomoniella chlamydospora*::*gfp1* a été observée 12 semaines après inoculation. L'inoculation est efficace pour cette espèce puisque la zone d'inoculation était couverte de mycélium 12 semaines après inoculation (Figure 24 A). Aucun signal GFP n'a été détecté dans les tissus des témoins blessés (Figure 24 B). La colonisation de cette espèce a été plus importante dans les tissus de l'entre-nœud comparée à l'inoculation en modèle plaie de taille. Suite à l'inoculation au niveau de l'entre-nœud, *P. chlamydospora*::*gfp1* a colonisé uniquement les vaisseaux du xylème 12 semaines après inoculation (Figure 24 C-E). Les fibres du xylème n'ont pas été envahies par le pathogène (Figure 24 C-D). La colonisation au niveau du nœud, suite à l'inoculation d'une plaie de taille, se limite à la zone inoculée et à la couche de tissus nécrosés adjacente (Figure 24 I).

Les tissus de l'entre-nœud de la vigne ont répondu aux traitements 12 semaines après inoculation. Les vaisseaux du xylème ont présenté des tyloses ralentissant la progression du champignon dans les vaisseaux (Figure 24 D). Ces tyloses ont également été observées en coupe transversale environ 8 mm au-dessus de la zone inoculée (Figure 24 E). A ce niveau, l'occlusion des vaisseaux de xylème par les tyloses était partielle et quelquefois complète (Figure 24 E). Les fibres entourant les vaisseaux de xylème thylosés présentaient un halo de fluorescence qui n'a pas été observé autour des vaisseaux sans tylose (Figure 24 D-E). Une réponse des rayons a également été détectée (ZR délimitées Figure 24 E).

La réponse de bois de l'entre-nœud inoculé avec *P. chlamydospora*::*gfp1* était similaire à la réponse des tissus chez les témoins blessés. Les cellules du parenchyme émettaient une fluorescence bleue (Figure 24 F et H) et certains vaisseaux du xylème présentaient des tyloses. Aucune zone de réponse à la blessure ou à l'infection n'était présente au point d'inoculation (Figure 24 A-B). La réponse à la blessure semblait similaire à la réponse à l'infection, néanmoins celle-ci semblait contraignante pour la colonisation de *P. chlamydospora*::*gfp1* 12 semaines après inoculation.

Aucune zone de réponse n'a été remarquée dans les tissus au niveau du nœud 12 semaines après inoculation.

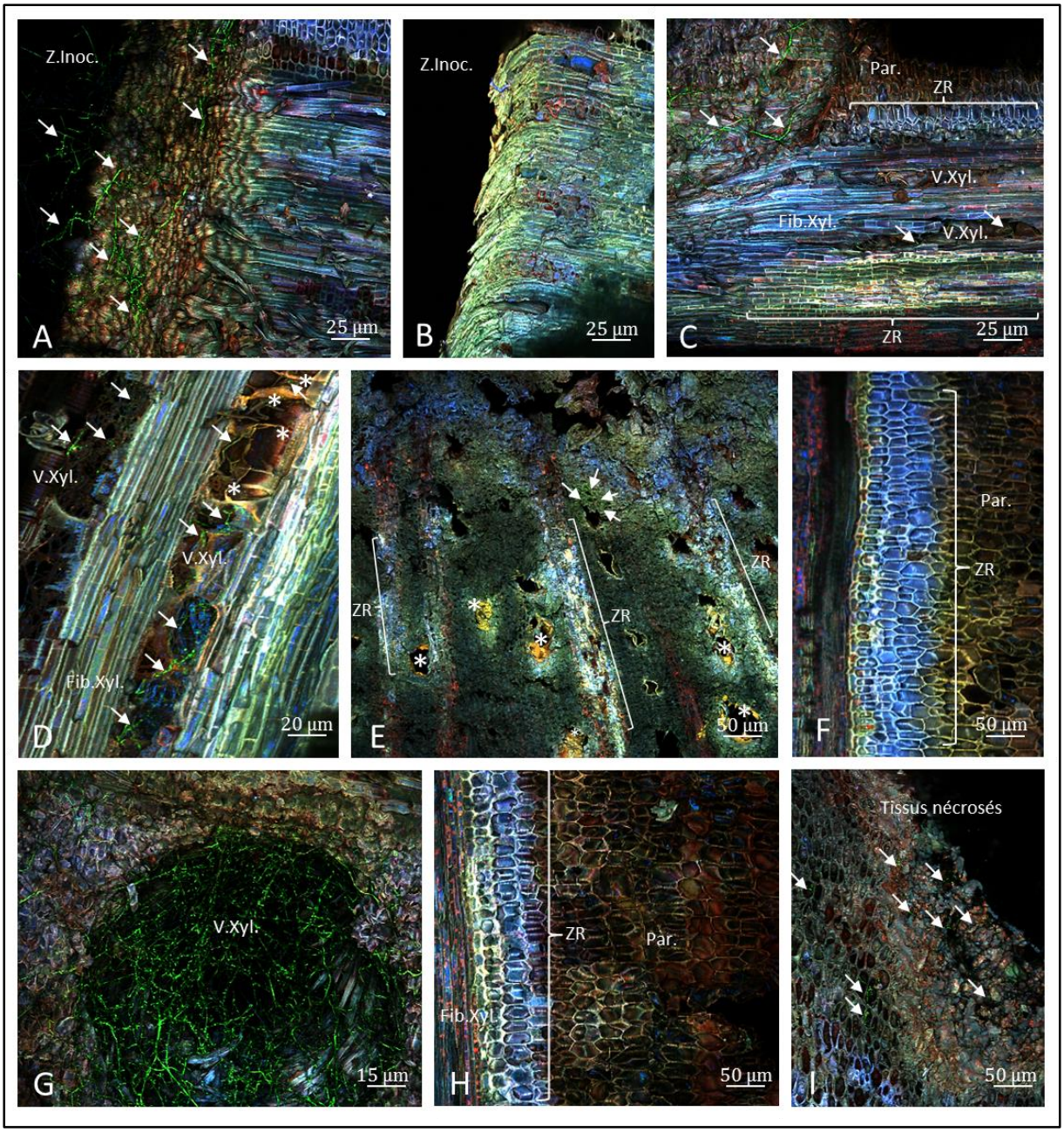


Figure 24 Colonisation du bois de la vigne par P. chlamydospora::gfp1 12 semaines après inoculation. (A-H) Colonisation de la blessure au niveau de l'entre-nœud. (A-F) Coupes transversales. A) La zone d'inoculation est couverte par du mycélium exprimant le gène gfp (flèches). B) Les témoins blessés ne sont pas infectés. C) Colonisation des vaisseaux du xylème et réponse de la vigne au niveau du parenchyme et des fibres de xylème. D) Le champignon colonise les vaisseaux du xylème. Des tyloses sont observables (*) et ralentissent la progression du pathogène. E) Coupe transversale présentant les zones de réponse de la plante ainsi que les vaisseaux de xylème thylosés (*) entourés par un halo de tissus fluorescents. F) Réponse des tissus dans les témoins blessés en coupe longitudinale. G) Coupe transversale présentant un vaisseau du xylème fortement colonisé. H) Réponse des tissus de bois inoculés avec la souche transformée. I) La colonisation d'une plaie au niveau du nœud de la plante se limite à la zone d'inoculation et la couche de cellules nécrosées adjacente. Z.Inoc : Zone Inoculée, les flèches pointent la présence de P. chlamydospora::gfp1, Par. : Parenchyme, V.Xyl. : Vaisseau du Xylème ; Fib.Xyl. : Fibre du Xylème ; ZR : Zone de Réaction.

1.3 LES EVENEMENTS PRECOCES DE LA COLONISATION DU BOIS DE *VITIS VINIFERA* L. PAR *PHAEOMONIELLA CHLAMYDOSPORA* CO-INOCULE AVEC *PHAEOACREMONIUM ALEOPHILUM*

La co-inoculation de *P. chlamydospora*::*gfp1* avec la souche sauvage de *P. aleophilum* n'a pas modifié la colonisation de *P. chlamydospora*::*gfp1* (Figure 25). La plaie de taille au niveau du nœud n'a pas été colonisée hormis les tissus nécrosés par la blessure. *P. chlamydospora*::*gfp1* a colonisé l'entre-nœud avec plus de réussite. Uniquement les vaisseaux du xylème ont été colonisés par *P. chlamydospora*::*gfp1* (Figure 25 A-D). Aucun signal GFP marquant la présence de ce pathogène n'a été détecté dans les fibres du xylème 12 semaines après avoir été co-inoculé avec *P. aleophilum* (Figure 25 C-D). Le xylème de l'entre-nœud a répondu aux traitements. Les vaisseaux du xylème ont été comblés par des tyloses semblant gêner la progression de *P. chlamydospora*::*gfp1* (Figure 25 C). Les cellules parenchymateuses proches des fibres de xylème ont émis une fluorescence bleue claire semblant associée à l'épaississement de leurs parois. Il n'a pas été possible de différencier la réponse à la blessure et la réponse à l'infection dans le tissus de l'entre-nœud 12 semaines après inoculation. Aucune réponse observable en microscopie à fluorescence n'a été détectée suite à l'inoculation en modèle plaie de taille.

1.4 DISCUSSION DE L'APPROCHE HISTOLOGIQUE DE LA COLONISATION PRECOCE DE *P. ALEOPHILUM* ET *P. CHLAMYDOSPORA*.

La colonisation des champignons *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* a été observée en marquant des souches avec le gène codant la GFP. Les souches transformées en utilisant *Agrobacterium tumefaciens* ont présenté différentes intensités de fluorescence. La souche ayant la fluorescence la plus intense, sans présenter de perturbations physiologiques sur boite par rapport à la souche sauvage, a été sélectionnée. Il s'agit de *P. aleophilum*::*gfp7* et de *P. chlamydospora*::*gfp1*. Les objectifs de l'étude de la colonisation de ces souches étaient (i) d'identifier quels sont les premiers tissus envahis par ces pathogènes en fonction du type de tissus lignifiés (modèle entre-nœud et modèle plaie de taille) et de (ii) comparer la réponse du bois de la vigne à la colonisation suivant l'espèce de champignon et le modèle d'inoculation.

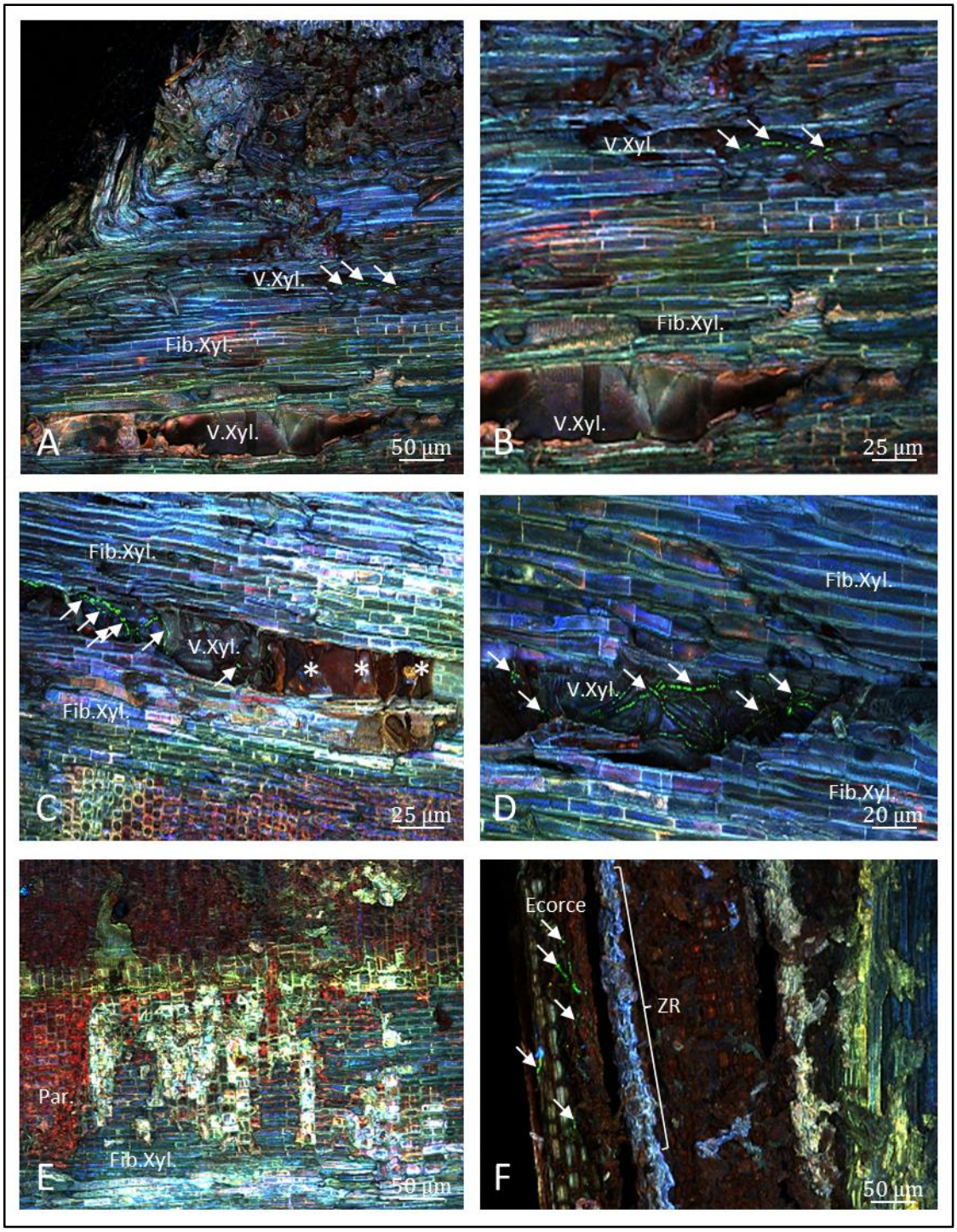


Figure 25 Colonisation du bois de la vigne par P. chlamydospora::gfp1 co-inoculé avec P. aleophilum (non marqué) 12 semaines après inoculation. (A-B) Colonisation des vaisseaux du xylème uniquement, les fibres de xylème ne sont pas envahies. C) Les vaisseaux de xylème présentent des tyloses(*) contraignant la progression du pathogène. D) A plus fort grossissement aucun mycélium n'est visible dans les fibres tandis que les vaisseaux du xylème sont colonisés. E) Réponse des cellules de parenchyme adjacentes aux fibres de xylème. Une fluorescence bleu-blanche semble associée au renforcement des parois cellulaires. F) Réponse des cellules de xylème porche du cambium (zone de décrochement entre l'écorce et le bois) limitant la progression de P. chlamydospora::gfp1. Les flèches pointent la présence de P. chlamydospora::gfp1, Par. : Parenchyme, V.Xyl. : Vaisseau du Xylème ; Fib.Xyl. : Fibre du Xylème ; ZR : Zone de Réaction.

La colonisation de la souche *P. aleophilum*::*gfp7* a été comparée à la colonisation de la souche sauvage marquée avec la sonde non spécifique Alexa Fluor® 488 WGA. Il n'y avait pas de différence de colonisation entre les souches. Le marquage non spécifique révèle que les contrôles possèdent une microflore endophytique, émettant un signal beaucoup moins important que les plantes inoculées. L'existence de la microflore endophytique dans le bois de la vigne est documentée (Bruez et al. 2011; Pancher et al. 2012). Les zones d'inoculations étaient couvertes de mycélium. Les modèles entre-nœud et plaie de taille sont infectés de manière homogène.

1.4.1 Colonisation précoce des tissus du bois

La colonisation de *P. aleophilum* a été plus importante dans l'entre-nœud par rapport à l'inoculation en modèle plaie de taille où la progression du pathogène était quasi nulle 6 semaines après inoculation. *P. aleophilum* a colonisé les deux types de tissus 12 semaines après inoculation tandis que *P. chlamydospora* n'a colonisé que le modèle entre-nœud. Concernant la colonisation en modèle entre-nœud, les deux espèces ne colonisent pas les mêmes tissus du xylème 12 semaines après inoculation. En effet *P. chlamydospora*::*gfp1* n'a été observé que dans les vaisseaux du xylème, tandis que *P. aleophilum* a colonisé les vaisseaux du xylème et les fibres du xylème. Ces observations sont en accord avec les travaux de microscopie localisant *P. chlamydospora* dans les vaisseaux du xylème (Landi et al. 2012; Valtaud et al. 2009), cependant les fibres et le parenchyme sont colonisés par ce pathogène dans ces études. Il se pourrait que la souche soit moins virulente suite à la transformation ou que l'ajout d'un point de cinétique supplémentaire permette cette observation. La colonisation de *P. aleophilum* 12 semaines après inoculation confirme les observations réalisées avec des techniques non spécifiques (Valtaud et al. 2009) et par immunolocalisation (Fleurat-Lessard et al. 2014). Cette dernière étude a remarquablement mis en évidence que les seuls tissus dégradés par *P. aleophilum* sont les parois des fibres du xylème. Or, cette espèce possèderait plus de capacités à dégrader le bois que *P. chlamydospora* (Valtaud et al. 2009). La moelle des sections de vigne a également été colonisée par *P. aleophilum*. Dans les tissus éloignés de 8 mm de la zone d'inoculation, *P. aleophilum* a seulement été observé dans les fibres du xylème et très peu dans les vaisseaux de xylème 12 semaines après inoculation. Les fibres du xylème seraient donc le tissu site de l'interaction précoce entre *P. aleophilum* et la vigne dans les conditions fixées par le modèle entre-nœud. Cette hypothèse est renforcée

par l'observation de la colonisation 6 semaines après inoculation. En effet *P. aleophilum* a fortement envahi les fibres du xylème à ce pas de temps tandis que très peu de signal GFP a été perçu dans les vaisseaux de xylème. Il semblerait donc que *P. aleophilum* colonise les fibres avant d'envahir les vaisseaux du xylème. *P. chlamydospora* coloniserait uniquement les vaisseaux du xylème. La co-inoculation de *P. chlamydospora*::*gfp1* avec la souche sauvage *P. aleophilum* n'a pas modifié la colonisation. Le marquage non spécifique de *P. aleophilum* révèlera si cette espèce colonise également les fibres du xylème lors de la co-inoculation. *P. chlamydospora* ne colonise pas les fibres en présence de *P. aleophilum*. Enfin la réponse du tissu à *P. chlamydospora* a semblé importante par rapport à la quantité de mycélium présente dans les vaisseaux du xylème.

1.4.2 Réponse des tissus du bois inoculé

Les inoculations en modèle plaie de taille ou en modèle entre-nœud ont toutes deux révélé des zones de réactions fluorescentes en réponse à la blessure 12 semaines après inoculation. La présence du pathogène semble avoir un impact minime sur la réaction des tissus par rapport au stress généré par la blessure 12 semaines auparavant. Les cellules du parenchyme entourant les fibres et les vaisseaux du xylème émettent une fluorescence bleue parfois rosée. Ces composés rayonnant dans le bleu pourraient correspondre à des stilbènes (Bellow et al. 2012). Certaines cellules de la moelle répondent également au traitement. Ces cellules ont été moins colonisées par *P. aleophilum*. Les vaisseaux de xylème colonisés par *P. chlamydospora* ou *P. aleophilum* ont présenté des tyloses semblant freiner la progression des pathogènes 12 semaines après inoculation.

La réponse des tissus du bois de la vigne en modèle plaie de taille semblerait sensible à la présence de *P. aleophilum* 6 semaines après inoculation. En effet, une intense bande de fluorescence a été observée dans les couches de cellules proches de la zone d'inoculation. La fluorescence émise par ces cellules était plus importante dans les plantes infectées avec *P. aleophilum* que dans les témoins blessés. Les longueurs d'ondes émises par les zones de réaction étaient différentes lorsque les plantes ont été traitées avec *P. aleophilum*::*gfp7* ou *P. aleophilum*. La souche transformée a induit une fluorescence bleue, verte et jaune tandis que seule la fluorescence bleue a été induite en réponse aux deux souches. Dans ce tissu également l'induction de stilbènes est envisageable.

En conclusion la colonisation de *P. aleophilum* semble associée aux fibres du xylème avant de coloniser les vaisseaux du xylème. *P. chlamydospora* ne coloniserait que les vaisseaux du xylème. La colonisation a plus de réussite en modèle entre-nœud plutôt qu'en modèle plaie de taille. Dans les deux cas une réponse des tissus est visible. En modèle entre-nœud le parenchyme entourant les fibres et les vaisseaux du xylème émet une fluorescence bleue qui pourrait correspondre à des stilbènes. Les vaisseaux de xylème colonisés ont été comblés par des tyloses freinant la progression des pathogènes, phénomène décrit par d'autres auteurs (Mori et al. 2001). Les couches de cellules entourant la plaie de taille répondent en émettant différentes fluorescences, la plus constante étant dans le bleu et donc possiblement des stilbènes (Bellow et al. 2012). La blessure inoculée avec un pathogène n'induit pas de réaction différente en comparaison au témoin blessé 12 semaines après inoculation. Toutefois la plante semble répondre différemment à la présence de *P. aleophilum* en modèle plaie de taille 6 semaines après inoculation. La perception du bois de la vigne serait donc sensible à la présence d'un organisme dans la blessure. Cette hypothèse concorderait avec la réponse histologique observée dans le bois inoculé avec *P. chlamydospora* (Pouzoulet et al. 2013).

2 APPROCHE MOLECULAIRE DES INTERACTIONS PRECOCES ENTRE LE BOIS DE LA VIGNE ET LES CHAMPIGNONS ASSOCIES AU « YOUNG ESCA »

Les deux espèces de champignons associées à l'esca *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* n'ont pas colonisé les mêmes tissus du bois de la vigne 6 semaines et 12 semaines après inoculation. Les deux pathogènes ont colonisé l'entre-nœud beaucoup plus aisément que la plaie de taille au niveau du nœud de la plante. Il se pourrait que la différence de colonisation entre les deux types de modèles d'inoculations émane d'une réponse différente du bois au stress causé par les traitements.

L'étude histologique a permis de mettre en évidence diverses fluorescences dans les tissus traités. La réponse des tissus inoculés pourrait être spécifique 6 semaines après l'inoculation de *P. aleophilum* par rapport à la réaction des tissus du témoin blessé. Cependant cette spécificité a disparu 12 semaines après inoculation de *P. aleophilum*, *P. chlamydospora* ainsi que lors de la co-inoculation. D'autre part la cicatrisation des tissus de l'entre-nœud est différente suivant l'identité du pathogène inoculé (Pouzoulet et al. 2013). Il semblerait que les cellules du bois de la vigne soient dotées de la machinerie cellulaire permettant de reconnaitre spécifiquement les micro-organismes durant les premières semaines suivant l'infection. Une étude de l'expression des gènes de défense a été entreprise afin de consolider notre hypothèse selon laquelle le bois de la vigne serait capable d'exprimer une défense spécifique selon l'identité du pathogène dans les quelques heures suivant l'inoculation.

Pour cela 3 lots de 5 plantes ont été inoculés avec *P. aleophilum*, *P. chlamydospora* ou co-inoculés. Les lots contrôles sont des plants non-traités et des plantes blessées inoculées avec du milieu PDA stérile. L'échantillonnage a eu lieu 10 h, 24 h, 48 h et 120 hpi. Un total de 255 plantes a été nécessaire pour cette étude d'expression de gène. Neufs plantes de chaques modalités de traitements ont été conservées durant 9 semaines, un pas de temps intermédiaire aux points de cinétique fixés en microscopie, afin de constituer trois échantillons dédiés à la quantification de l'ADN fongique. Cette quantification était un témoin de la bonne colonisation des modèles d'inoculation par les champignons *P. aleophilum* et *P. chlamydospora*. Elle avait également pour objectif de vérifier la qualité sanitaire des plantes non traitées.

2.1 CONTROLE DE LA COLONISATION DES MODELES ENTRE-NŒUD ET PLAIE DE TAILLE

Avant d'étudier l'expression précoce des gènes du bois de la vigne en réponse à la colonisation des pathogènes associés à l'esca, un contrôle attestant que les souches sauvages de *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* colonisent bien les deux types de modèles a été réalisé. La méthode de quantification de l'ADN des champignons associés aux maladies du bois développée par Jérôme Pouzoulet permet de contrôler la colonisation des tissus dans nos différents modèles (Figure 26).

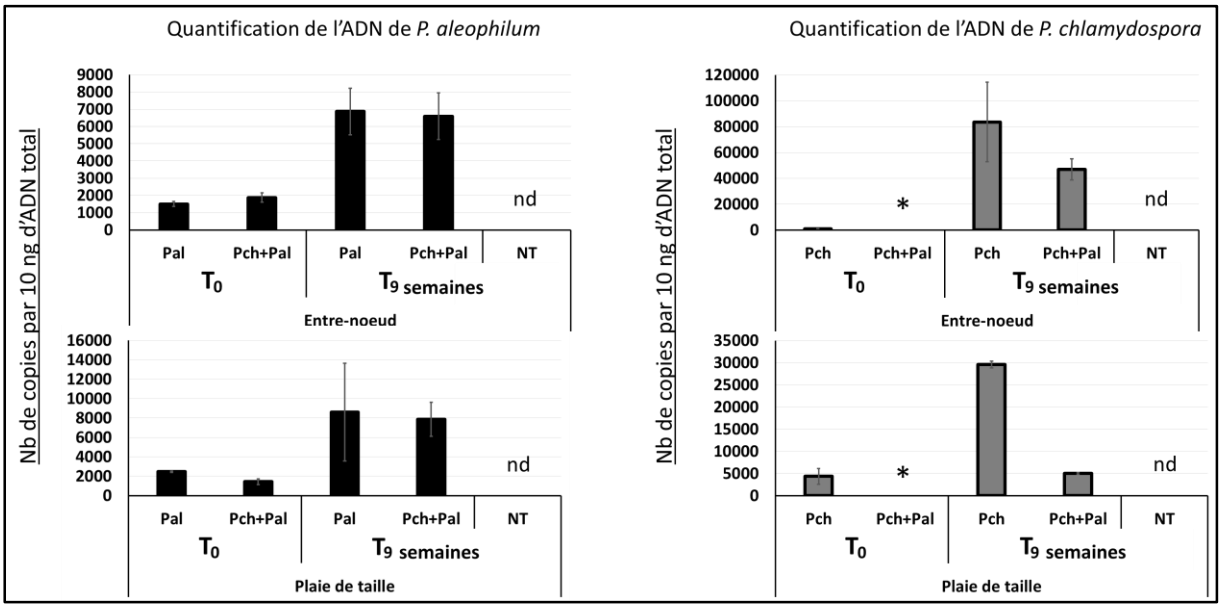


Figure 26 Quantification de l'ADN fongique de P. aleophilum et P. chlamydospora. Echantillonnages immédiatement après inoculation (T_0) ou bien après neuf semaines (T_9). nd : non *détectable* ; * : détectable mais non quantifiable. Les barres d'erreurs correspondent à ± 1σ à la moyenne de deux répétitions biologiques.

Aucun ADN spécifique à *P. aleophilum* ou *P. chlamydospora* n'a été détecté dans les lots de plantes non-traitées. Les quantités mesurées entre le temps T_0 et le temps T_9 semaines après inoculation ont attesté que les deux modèles d'inoculation ont permis la colonisation du bois par les deux espèces de champignons. D'autre part, le mycélium s'est bien développé dans ces tissus.

2.2 CINETIQUE COURTE DE LA REPONSE A LA BLESSURE CHEZ *VITIS VINIFERA* L.

2.2.1 Les gènes étudiés et leurs fonctions

Onze gènes ont été sélectionnés pour cette étude (Tableau 3), suivant qu'ils marquent une voie hormonale de défense (SA ou JA) ou bien pour leurs propriétés antifongiques. Pour la plupart d'entre eux la fonction est déduite du phénotypage sur d'autres modèles tels que *Arabidopsis,* et cette fonction est assumée similaire dans les tissus foliaires chez la vigne. Seule l'expression du gène *TL* a déjà été étudiée dans le bois de la vigne. Il s'agit d'une comparaison de l'expression de gènes au vignoble entre des ceps amenés à exprimer des symptômes foliaires d'esca plus tard dans la saison ou à demeurer sains (Spagnolo et al. 2011).

Tableau 3 La fonction des gènes étudiés.

Gènes	Fonction	Références
EF1-α	Elongation Factor 1α : gène de ménage	(Terrier et al. 2005)
LOX9	Lypoxygènases : oxydation des lipides en dérivés hydropéroxydes. Certaines sont impliquées dans la synthèse de l'acide jasmonique (JA). JA est une hormone de la défense chez les plantes, associée à la réponse à la blessure chez *Arabidopsis*.	(Aziz et al. 2003; Turner et al. 2002)
PAL	Phénylalanine ammonia-lyase : première étape de la synthèse du squelette des phénylpropanoïdes (voies de biosynthèse des lignines, flavonoïdes et coumarines). C'est un marqueur de la défense associée à l'acide salicylique.	(Aziz et al. 2003; Jones 1984)
PR10.3	Protéine possédant les motifs structurels nécessaires à l'activité ribonucléolytique. Elle serait impliquée dans la réponse antivirale. Cette protéine est un marqueur de la défense associée à l'acide salicylique.	(Castro et al. 2008)
TLb	Thaumatin-like : protéines PR5 présentant des propriétés antifongiques.	(Perazzolli et al. 2010)
TL		(Spagnolo et al. 2011)
CAM	Calmoduline : enzyme impliquée dans la signalisation lors de la reconnaissance d'un micro-organisme par la cellule végétale. Ces protéines sont des senseurs des flux de Ca^{2+}. En fonction de la signature Ca^{2+} du cytosol, celles-ci vont agir sur leur protéine cible.	(Perazzolli et al. 2010)
STS8	Stilbènes synthases : catalysent la condensation du 3 Malonyl CoA et d'un Coumaryl CoA afin de former un resveratrol (molécules diphényle pouvant former des viniférines, ptérostilbénes ou des picéides). Ces composés présentent des propriétés antifongiques.	(Dai et al. 2012; Robert et al. 2001)
STS		(Robert et al. 2001)
CWinv	Cell Wall invertase : enzyme pariétale hydrolysant des sucres apoplastiques afin d'approvisionner en énergie la cellule	(Polesani et al. 2010; Sherson et al. 2003)
Vv17.3	Protéine dont la fonction est inconnue. Marqueur de la défense associée à l'acide salicylique	(Bordiec et al. 2011)
PIN	Protéinase inhibitor	(Ryan 1978; Farmer and Ryan 1992; Belhadj et al. 2008)

2.2.2 La réponse à la blessure du bois chez *Vitis vinifera* L. en l'absence de pathogènes

La blessure infligée aux tissus ligneux représente un stress important pour la plante. Il était donc nécessaire d'observer la réponse moléculaire dans les tissus de bois blessé. Pour cela l'induction relative des gènes de défense dans le témoin inoculé avec du milieu stérile (traitement mock) a été calculée par rapport aux expressions basales mesurées dans le témoin non-traité. Deux modèles d'inoculation ont été testés, le modèle entre-nœud et le modèle plaie de taille. Dans notre étude, une induction est considérée comme biologiquement significative lorsque celle-ci est inférieure à 0,5 (le gène est réprimé deux fois plus suite à un traitement par rapport au témoin non-traité) ou supérieure à 2 (le gène est deux fois plus induit que chez le témoin non-traité) (Spagnolo et al. 2011). C'est une échelle arbitraire qui ne prédit en rien la présence et l'activité des enzymes codées par ces gènes.

Les tissus des différentes parties du tronc de la bouture ont répondu localement à la blessure entre 10 h et 120 h après avoir été endommagés (Figure 27). Les gènes *PAL*, *PR10.3*, *TL*, *TLb*, *Vv17.3*, *STS et STS8* ont été induits dans les tissus de l'entre-nœud blessé par rapport aux témoins non-traités (Figure 27 A). L'expression des gènes *CWinv* et *PIN* n'a pas été modifiée par le stress de la blessure. Enfin les gènes *CAM* et *LOX9* ont été réprimés par la blessure dans l'entre-nœud pour certains points de cinétiques. *CAM* a été réprimé 10h et 48h après inoculation tandis que *LOX9* a été réprimé 24h, 48h et 120h après traitement.

En modèle plaie de taille, la réponse locale est différente par rapport au modèle entre-nœud (Figure 27 B). Le gène *CAM* a été fortement induit par la blessure. Les gènes *PAL*, *PR10.3*, *STS*, *STS8*, *TLb* et *Vv17.3* ont été induits. Le gène *TL* n'a pas été induit par la blessure. Enfin l'expression des gènes *CWinv*, *PIN* et *LOX9* a été réprimée. *CWinv* a été réprimé 10h et 120h après traitement, *PIN* au point de cinétique 10h et *LOX9* 10h et 24h après inoculation. Ensuite les inductions pour ces gènes ne sont pas biologiquement significatives.

Les tissus de bois inoculés en modèle plaie de taille ou en modèle entre-nœud n'auraient pas répondu de la même manière à la blessure (Figure 27). Les inductions des gènes *CAM* et *TL* illustrent cette différence. Les facteurs d'inductions relatives de tous les gènes ont été normalisés par traitement des données avec le logarithme népérien. Un modèle linéaire général a permis d'isoler l'effet du modèle dans l'explication de la variation des facteurs d'inductions observés. Le modèle entre-nœud et le modèle plaie de taille ont donc présenté

une réponse significativement différente à la blessure (F = 65.5408, p-value = 3.269e-15 < 0.05).

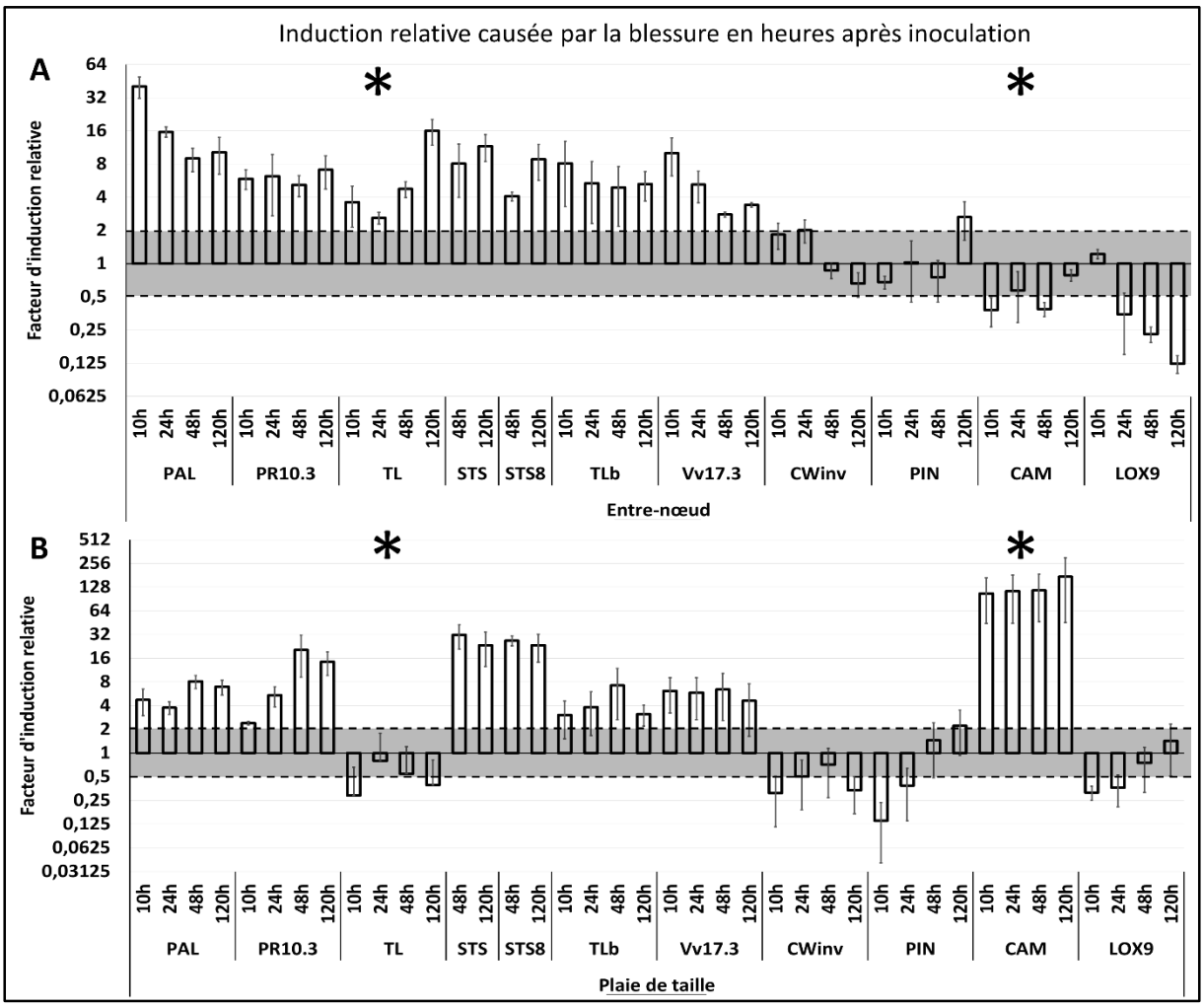


*Figure 27 Réponse moléculaire du bois de la vigne à la blessure. Induction des gènes par rapport au témoin non traité (induction = 1) 10h, 24h, 48h et 120h après traitement au niveau A) de l'entre-nœud, B) de la plaie de taille (région nodale). Les inductions en dehors du rectangle grisé sont biologiquement significatives. Les gènes dont l'expression discrimine les modèles d'inoculation sont marqués d'une *. Les barres d'erreurs correspondent à ± 1σ à la moyenne de trois répétitions biologiques.*

Les comportements de chaque gène suivant les différents traitements et modèles d'inoculation peuvent donc être analysés en gardant à l'esprit la réponse des différents tissus à la blessure.

2.3 PERCEPTION DES PATHOGENES ASSOCIES A L'ESCA DANS LE BOIS DE *VITIS VINIFERA* L.

La mesure du facteur d'induction de différents gènes de défense suite à la blessure a été possible de manière répétable. Des plantes blessées ont été inoculées avec du mycélium de *P. aleophilum* ou *P. chlamydospora* afin de déterminer si le bois de la vigne est capable de

percevoir si des pathogènes sont présents dans la blessure. Les gènes analysés sont regroupés en fonction de leurs réponses à la blessure.

2.3.1 Les gènes peu induits

Les gènes *CWinv* et *PIN* ont été peu induits par les traitements réalisés sur le bois de la vigne en considérant qu'une induction est biologiquement significative si elle est supérieure à 2x ou inférieure à 0.5x.

Cinétique d'expression du gène *CWinv*

Le gène *CWinv* n'a pas été fortement induit par les traitements en modèle entre-nœud et plaie de taille (Figure 28). L'induction de ce gène en modèle plaie de taille a présenté une forte variation entre les répétitions biologiques.

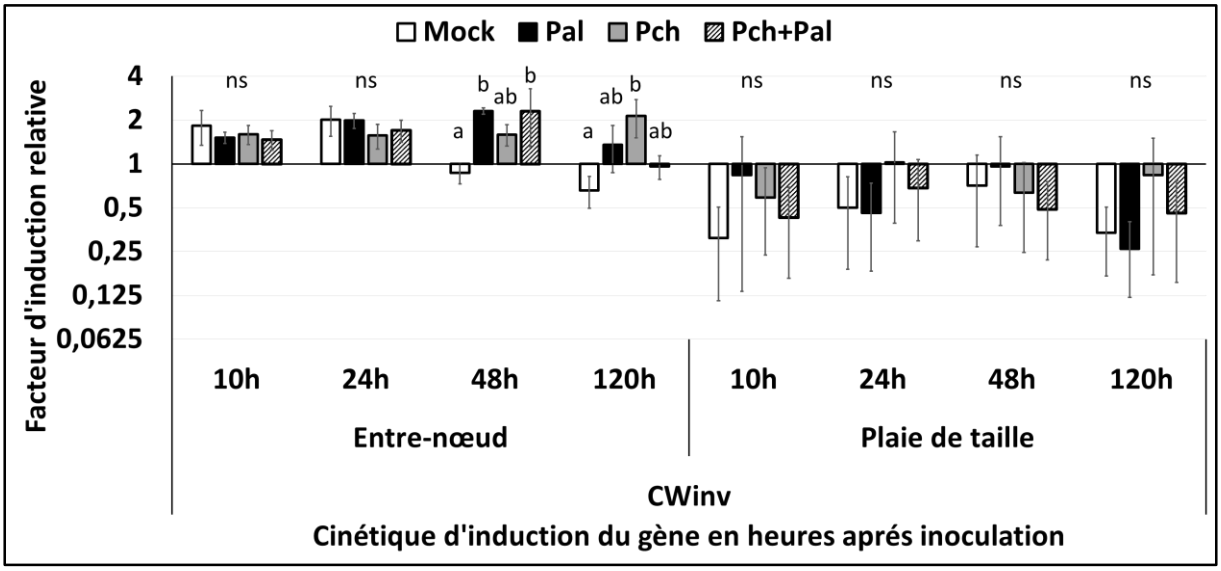


Figure 28 Cinétique de l'induction du gène CWinv en modèle entre-nœud et plaie de taille, 10h, 24h, 48h et 120h après blessure (mock) ou inoculation de P. aleophilum (Pal), P. chlamydospora (Pch) et des deux espèces co-inoculées (Pch et Pal). Les inductions sont relatives à l'expression du témoin non-traité (facteur d'induction = 1). Les groupes a, ab, b indiquent les inductions significativement différentes entre les traitements après une ANOVA et le test post-hoc de Tukey (α = 0.05). Les barres d'erreurs correspondent à ± 1σ à la moyenne de trois répétitions biologiques. ns : non significatif.

Les traitements *P. aleophilum* et la co-inoculation ont induit le gène *CWinv* significativement comparé au traitement mock 48 hpi ($F = 6.904$, p-value = 0.0131 < 0.05). Cet effet n'a pas été observé chez les plantes inoculées avec *P. chlamydospora*. *P. chlamydospora* a

significativement induit le gène *CWinv* par rapport au traitement mock 120 hpi (F = 6.564, p-value = 0.015 < 0.05).

Cinétique d'expression du gène *PIN*

Le gène *PIN* a été peu induit durant cette expérience. Les traitements en modèle entre-nœud ont légèrement induit *PIN* tandis que les traitements en modèle plaie de taille ont légèrement réprimé ce gène (Figure 29). Les répétitions biologiques en modèle plaie de taille ont présenté une variation plus importante par rapport au modèle entre-nœud. *P. chlamydospora* a induit le gène *PIN* d'un facteur 2 par rapport à la blessure 10 hpi (F = 6.086, p-value = 0.0231 < 0.05).

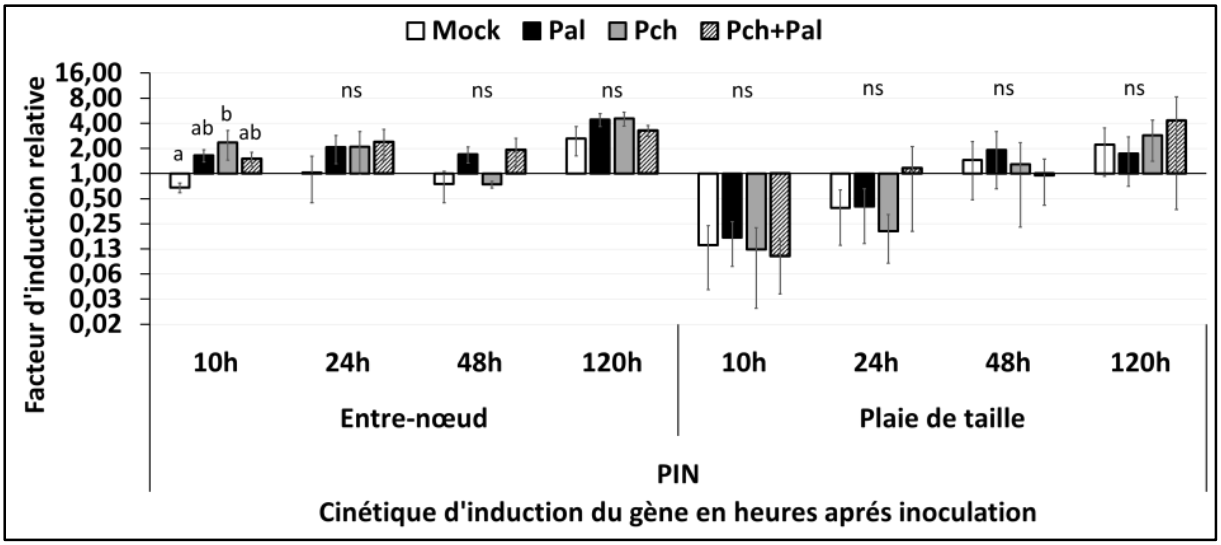


Figure 29 Cinétique de l'induction du gène PIN en modèle entre-nœud et plaie de taille, 10h, 24h, 48h et 120h après blessure (mock) ou inoculation de P. aleophilum (Pal), P. chlamydospora (Pch) et des deux espèces co-inoculées (Pch et Pal). Les inductions sont relatives à l'expression du témoin non-traité (facteur d'induction = 1). Les groupes a, ab, b indiquent les inductions significativement différentes entre les traitements après une ANOVA et le test post-hoc de Tukey (α = 0.05). Les barres d'erreurs correspondent à ± 1σ à la moyenne de trois répétitions biologiques. ns : non significatif.

2.3.2 Les gènes induits

Certains gènes ont été induits seulement dans un type de modèle d'inoculation. Ils seront décrits en premier avant d'aborder les gènes induits dans les deux tissus.

Cinétique d'expression du gène *CAM*

Comme pour la blessure, l'inoculation des pathogènes a induit différemment le gène *CAM* suivant qu'elle a été réalisée dans l'entre-nœud ou dans la plaie de taille (Figure 30). Aucune

différence significative d'induction causée par la présence de mycélium n'a été observée dans les deux types de tissus. Le gène *CAM* n'a donc été induit que par le stress causé par la blessure par rapport au témoin non traité.

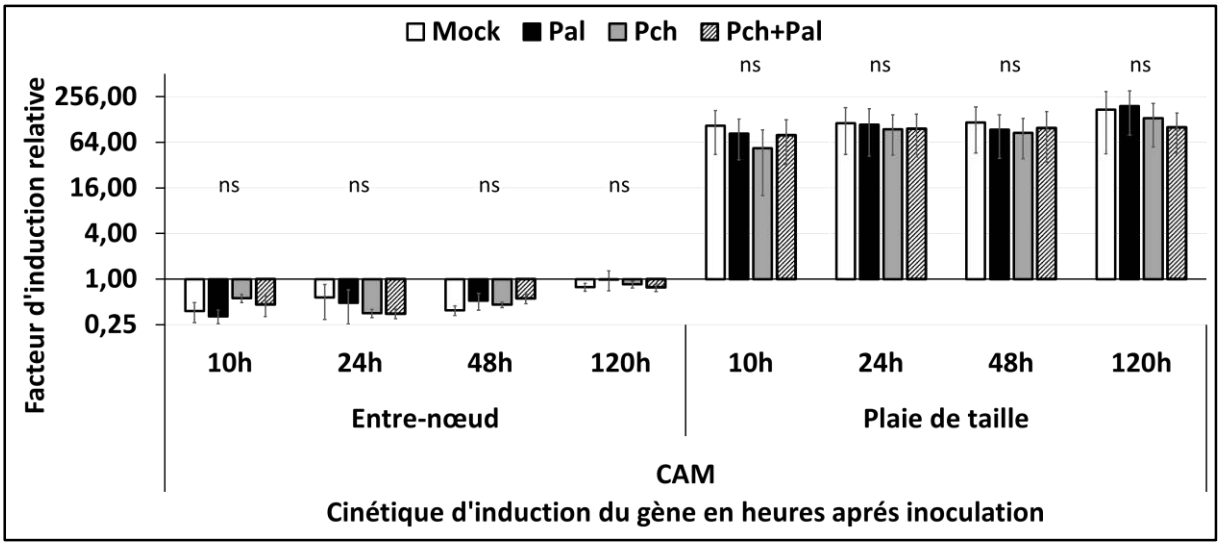


Figure 30 Cinétique de l'induction du gène CAM en modèle entre-nœud et plaie de taille, 10h, 24h, 48h et 120h après blessure (mock) ou inoculation de P. aleophilum (Pal), P. chlamydospora (Pch) et des deux espèces co-inoculées (Pch et Pal). Les inductions sont relatives à l'expression du témoin non-traité. Les groupes a, ab, b indiquent les inductions significativement différentes entre les traitements après une ANOVA et le test post-hoc de Tukey (α = 0.05). Les barres d'erreurs correspondent à ± 1σ à la moyenne de trois répétitions biologiques. ns : non significatif.

Cinétique d'expression du gène *TL*

Les inductions du gène *TL* causées par la blessure ont masqué l'effet de la présence des pathogènes à l'exception d'un point de la cinétique (Figure 31).

Phaeoacremonium aleophilum a induit le gène *TL* d'un facteur 4 par rapport au traitement mock en modèle entre nœud 48 hpi ($F = 6.211$, p-value = $0.0175 < 0.05$). La blessure en modèle entre-nœud induit ce gène tandis qu'il est réprimé en modèle plaie de taille.

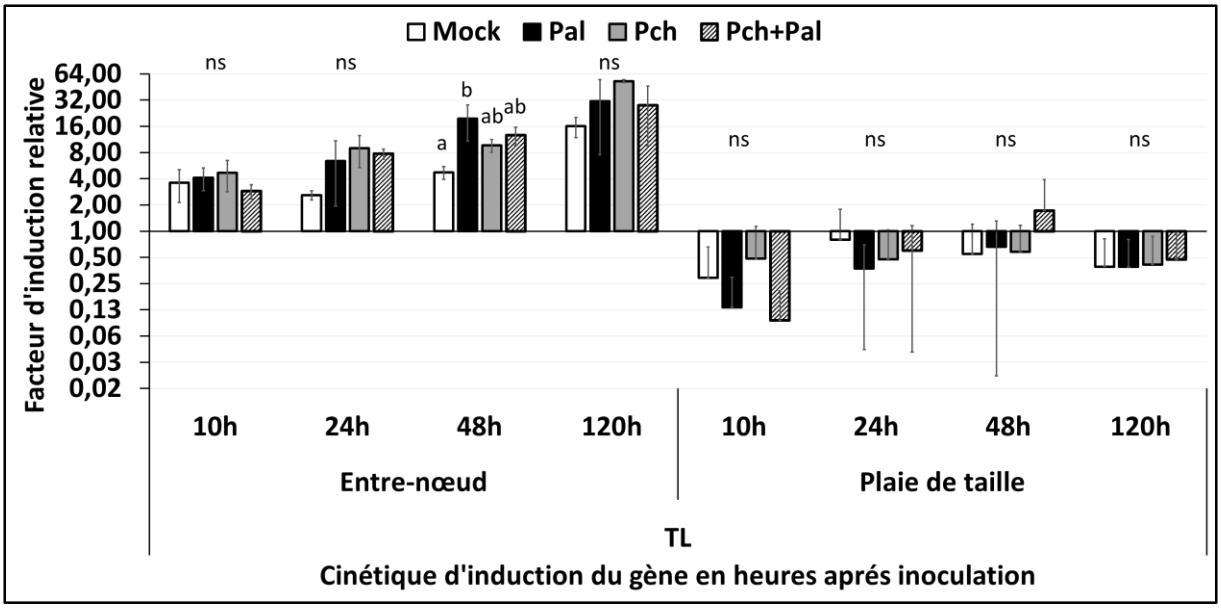


Figure 31 Cinétique de l'induction du gène TL en modèle entre-nœud et plaie de taille, 10h, 24h, 48h et 120h après blessure (mock) ou inoculation de P. aleophilum (Pal), P. chlamydospora (Pch) et des deux espèces co-inoculées (Pch et Pal). Les inductions sont relatives à l'expression du témoin non-traité. Les groupes a, ab, b indiquent les inductions significativement différentes entre les traitements après une ANOVA et le test post-hoc de Tukey (α = 0.05). Les barres d'erreurs correspondent à ± 1σ à la moyenne de trois répétitions biologiques. ns : non significatif.

Cinétique d'expression du gène *PAL*

Le gène *PAL* a été induit par les traitements en modèle entre-nœud et plaie de taille (Figure 32). En modèle entre-nœud, l'induction causée par les champignons était identique à celle causée par le traitement mock 10 hpi. La présence d'un pathogène a induit le gène *PAL* d'un facteur 2 par rapport au témoin blessé 24 hpi ($F = 8.663$, p-value = 0.0068 < 0.05). Cet effet a également été observé 48 hpi, toutefois l'espèce de champignon inoculée a modifié l'induction du gène *PAL* ($F = 20.23$, p-value = 0.000431 < 0.05). *P. aleophilum* a induit le gène *PAL* d'un facteur 2 par rapport à la présence de *P. chlamydospora* dans la blessure 48 hpi. Enfin, la co-inoculation n'a pas induit ce gène de manière différente par rapport aux inoculations simples 48 hpi. Le facteur d'induction de *PAL* est deux fois plus important suite à l'inoculation de *P. chlamydospora* par rapport à l'inoculation de *P. aleophilum*, la co-inoculation ou le traitement mock 120 hpi ($F = 18.37$, p-value = 0.000602 < 0.05).

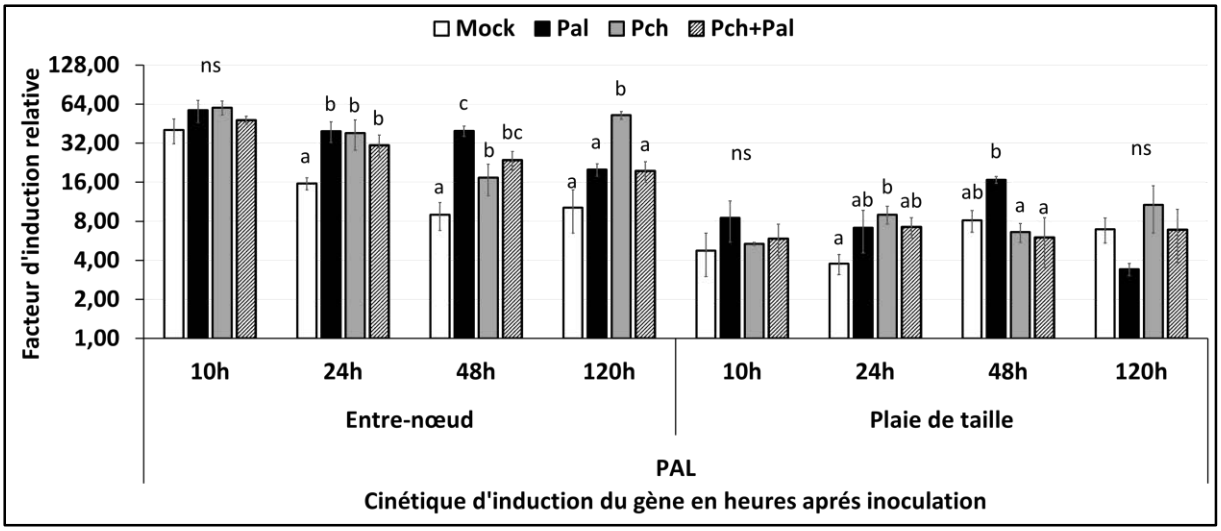


Figure 32 Cinétique de l'induction du gène PAL en modèle entre-nœud et plaie de taille, 10h, 24h, 48h et 120h après blessure (mock) ou inoculation de P. aleophilum (Pal), P. chlamydospora (Pch) et des deux espèces co-inoculées (Pch et Pal). Les inductions sont relatives à l'expression du témoin non-traité. Les groupes a, b, c indiquent les inductions significativement différentes entre les traitements après une ANOVA et le test post-hoc de Tukey (α = 0.05). Les barres d'erreurs correspondent à ± 1σ à la moyenne de trois répétitions biologiques. ns : non significatif.

En modèle plaie de taille seulement l'induction causée par la blessure a été mise en évidence 10 hpi. Il n'y a pas eu d'impact des traitements avec du mycélium à ce point de cinétique. *P. chlamydospora* a induit le gène *PAL* deux fois plus que le stress causé par la blessure 24hpi (F = 4.341, p-value = 0.043 < 0.05). *P. aleophilum* a induit deux fois plus le gène *PAL* par rapport au traitement *P. chlamydospora*, la co-inoculation ou bien le témoin blessé 48 hpi (F = 8.806, p-value = 0.00648 < 0.05). Aucune différence d'induction entre les différents traitements n'a été observée 120 hpi. Toutefois, l'induction causée par *P. chlamydospora* tendrait à être plus forte en comparaison à l'induction causée par *P. aleophilum* (F = 3.512, p-value = 0.069 > 0.05).

Cinétique d'expression du gène *PR10.3*

En modèle entre-nœud la présence d'un pathogène dans la blessure a induit le gène *PR10.3* environ deux fois plus comparé au traitement mock 10 hpi (F = 6.473, p-value = 0.0156 < 0.05) (Figure 33). Les inductions des plantes traitées avec du mycélium n'ont pas été différentes de l'induction causée par la blessure 24 hpi. *P. aleophilum* et la co-inoculation des deux espèces ont induit le gène *PR10.3* deux fois plus que *P. chlamydospora* ou le témoin blessé 48 hpi (F = 13.57, p-value = 0.00167 < 0.05). *PR10.3* a été deux fois plus induit en réponse à *P. aleophilum* ou *P. chlamydospora* par rapport au témoin blessé 120 hpi (F = 9.122, p-value = 0.00583 <

0.05). Cette distinction a disparu lorsque les deux espèces ont été co-inoculées dans l'entre-nœud.

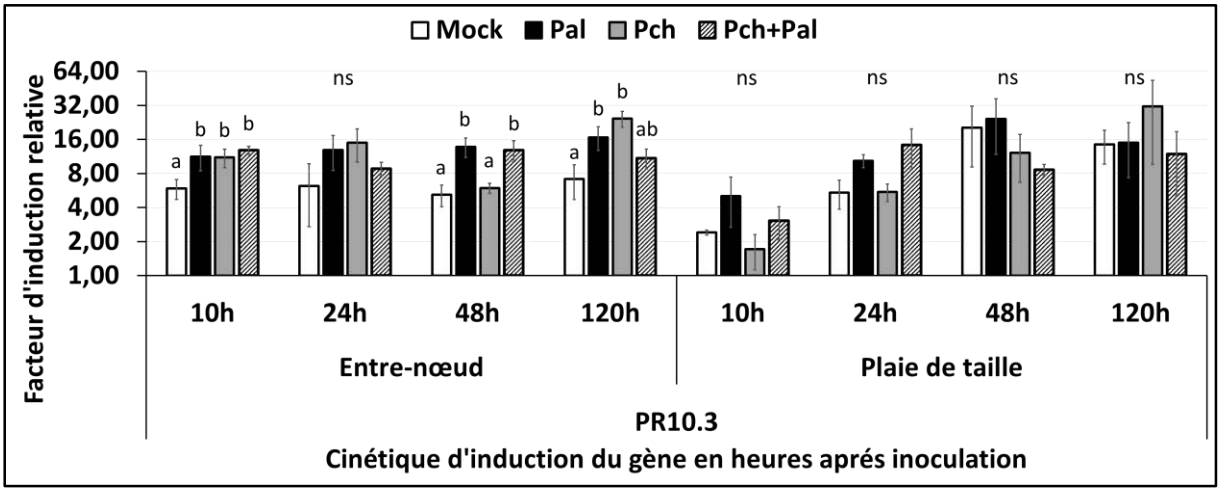


Figure 33 Cinétique de l'induction du gène PR10.3 en modèle entre-nœud et plaie de taille, 10h, 24h, 48h et 120h après blessure (mock) ou inoculation de P. aleophilum (Pal), P. chlamydospora (Pch) et des deux espèces co-inoculées (Pch et Pal). Les inductions sont relatives à l'expression du témoin non-traité. Les groupes a, b indiquent les inductions significativement différentes entre les traitements après une ANOVA et le test post-hoc de Tukey (α = 0.05). Les barres d'erreurs correspondent à ± 1σ à la moyenne de trois répétitions biologiques. ns : non significatif.

En modèle plaie de taille, la blessure a induit le gène *PR10.3* sans présenter d'effet de la présence de mycélium quel que soit le point de cinétique étudié.

Cinétique d'expression des gènes STS et *STS8*

L'expression des gènes *STS* et *STS8* a été mesurée pour les deux points de cinétique 48h et 120h post inoculation (Figure 34).

En modèle entre-nœud, la blessure a induit les gènes *STS* sans effet de la présence de champignons dans le tissu 48 hpi. *P. chlamydospora* tendrait à induire le gène *STS* d'un facteur 4 par rapport au témoin blessé 120 hpi ($F = 3.513$, p-value = 0.069 > 0.05). En modèle plaie de taille le gène *STS* a été induit deux fois plus par *P. chlamydospora* que par la co-inoculation des deux espèces fongiques 48 hpi ($F = 5.955$, p-value = 0.0195 < 0.05). Cependant les deux inductions ne sont pas différentes de l'induction causée par la blessure. La co-inoculation a induit ce gène d'un facteur deux par rapport à l'induction causée par *P. aleophilum* 120 hpi ($F = 4.193$, p-value = 0.0466 < 0.05).

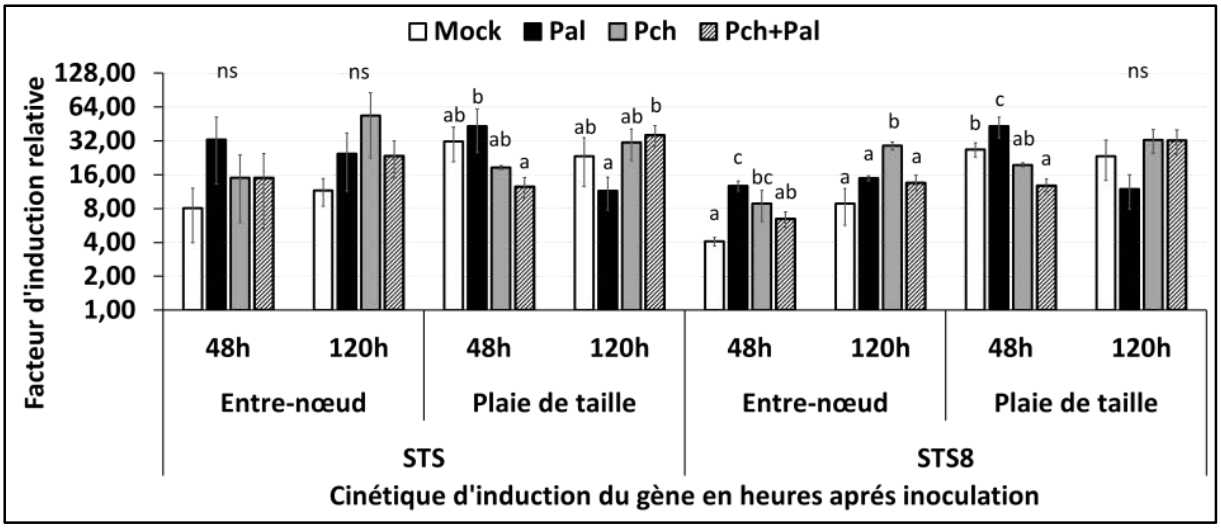


Figure 34 Cinétique de l'induction des gènes STS et STS8 en modèle entre-nœud et plaie de taille, 10h, 24h, 48h et 120h après blessure (mock) ou inoculation de P. aleophilum (Pal), P. chlamydospora (Pch) et des deux espèces co-inoculées (Pch et Pal). Les inductions sont relatives à l'expression du témoin non-traité. Les groupes a, b, c indiquent les inductions significativement différentes entre les traitements après une ANOVA et le test post-hoc de Tukey (α = 0.05). Les barres d'erreurs correspondent à ± 1σ à la moyenne de trois répétitions biologiques. ns : non significatif.

En modèle entre-nœud, le gène *STS8* a été plus induit par *P. aleophilum* en comparaison à la co-inoculation et au témoin blessé 48 hpi. *P. chlamydospora* a induit ce gène plus intensément que le témoin blessé à ce point de cinétique ($F = 14.37$, p-value = 0.00224 < 0.05). *P. chlamydospora* a plus induit le gène *STS8* comparé aux autres traitements 120 hpi ($F = 13.59$, p-value = 0.00166 < 0.05). En modèle plaie de taille, le gène *STS8* a été induit quatre fois plus par la présence de *P. aleophilum* que par la co-inoculation des deux espèces 48 hpi. La perception de *P. aleophilum* a induit *STS8* par rapport au mock tandis que la co-inoculation l'a réprimé ($F = 25.03$, p-value = 0.000203 < 0.05). Seule la blessure a induit ce gène 120 hpi par rapport au témoin non traité.

Cinétique d'expression du gène *TLb*

En modèle entre-nœud le gène *TLb* (Figure 35) a été induit quatre fois plus en réponse à *P. aleophilum* par rapport au témoin blessé 48 hpi ($F = 5.359$, p-value = 0.0257 < 0.05). *P. chlamydospora* a induit le gène *TLb* quatre fois plus que les autres traitements dont le témoin blessé 120 hpi ($F = 7.976$, p-value = 0.00867 < 0.05). La blessure a induit ce gène en modèle plaie de taille, cependant aucun effet de la présence de mycélium n'a été observé.

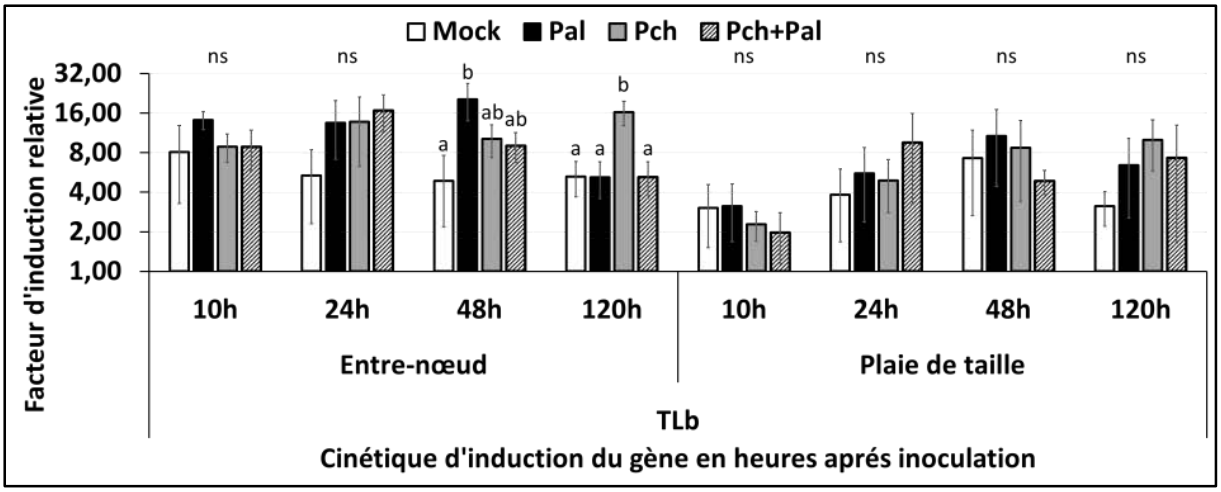


Figure 35 Cinétique de l'induction du gène TLb en modèle entre-nœud et plaie de taille, 10h, 24h, 48h et 120h après blessure (mock) ou inoculation de P. aleophilum (Pal), P. chlamydospora (Pch) et des deux espèces co-inoculées (Pch et Pal). Les inductions sont relatives à l'expression du témoin non-traité. Les groupes a, b indiquent les inductions significativement différentes entre les traitements après une ANOVA et le test post-hoc de Tukey (α = 0.05). Les barres d'erreurs correspondent à ± 1σ à la moyenne de trois répétitions biologiques. ns : non significatif.

Cinétique de l'expression du gène *Vv17.3*

L'expression du gène *Vv17.3* a fortement varié d'une répétition biologique à l'autre. Seule la blessure a induit le gène *Vv17.3* (Figure 36). Les autres traitements n'ont pas induit ce gène mis à part en modèle entre-nœud 120 hpi où ce gène a été induit par la présence de mycélium ($F = 25.39$, p-value = 0.00459 < 0.05).

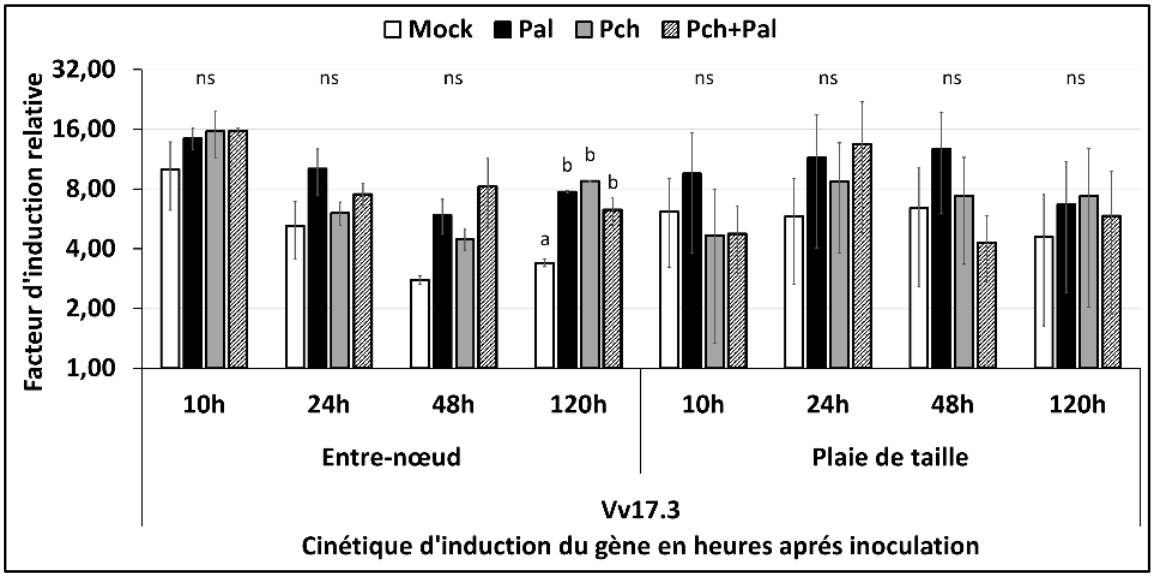


Figure 36 Cinétique de l'induction du gène Vv17.3 en modèle entre-nœud et plaie de taille, 10h, 24h, 48h et 120h après blessure (mock) ou inoculation de P. aleophilum (Pal), P. chlamydospora (Pch) et des deux espèces co-inoculées (Pch et Pal). Les inductions sont relatives à l'expression du témoin non-traité. Les groupes a, b indiquent les inductions significativement différentes entre les traitements après une ANOVA et le test post-hoc de Tukey (α = 0.05). Les barres d'erreurs correspondent à ± 1σ à la moyenne de trois répétitions biologiques. ns : non significatif.

2.3.3 Cinétique d'induction du gène réprimé *LOX9*

Le gène *LOX9* (Figure 37) a été réprimé par la blessure par rapport au témoin non traité. Aucun effet dû à l'inoculation de mycélium n'a été observé en modèle entre-nœud ou plaie de taille.

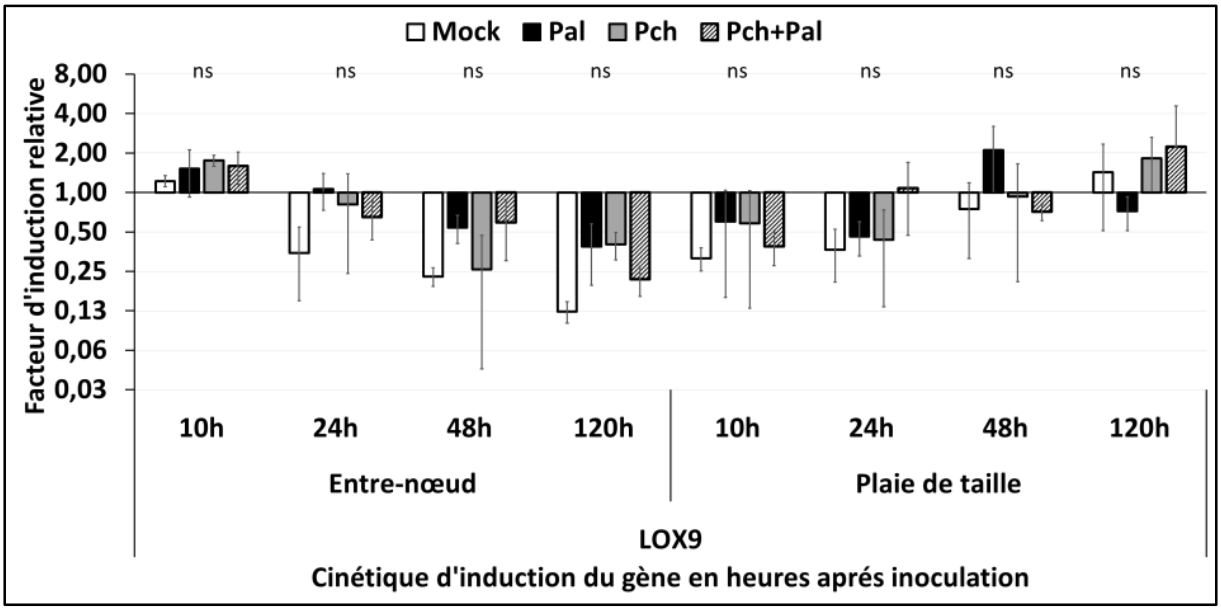


Figure 37 Cinétique de l'induction relative du gène LOX9 en modèle entre-nœud et plaie de taille, 10h, 24h, 48h et 120h après blessure (mock) ou inoculation de P. aleophilum (Pal), P. chlamydospora (Pch) et des deux espèces co-inoculées (Pch et Pal). Les inductions sont relatives à l'expression du témoin non-traité. Les groupes a, b indiquent les inductions significativement différentes entre les traitements après une ANOVA et le test post-hoc de Tukey (α = 0.05). Les barres d'erreurs correspondent à ± 1σ à la moyenne de trois répétitions biologiques. ns : non significatif.

2.4 DISCUSSION DE L'APPROCHE MOLECULAIRE DES INTERACTIONS PRECOCES VIGNE-MICROBES

L'objectif de cette approche moléculaire des interactions vigne-microbes était de mettre en évidence l'existence de défenses induites dans le bois de *Vitis vinifera* L. L'étude de l'expression des gènes de défense permet d'appréhender la régulation des défenses induites par la plante. Afin de faciliter la discussion, la Figure 38 synthétise les résultats de cette étude. Le bois de la vigne a fortement répondu à la blessure qui représente donc un stress important pour ce tissu. Neuf des onze gènes testés ont répondu à la blessure en modèle entre-nœud ainsi qu'en modèle plaie de taille. Les gènes n'ont pas répondu de la même manière en fonction du modèle d'inoculation. Il existerait donc des différences physiologiques entre ces deux tissus.

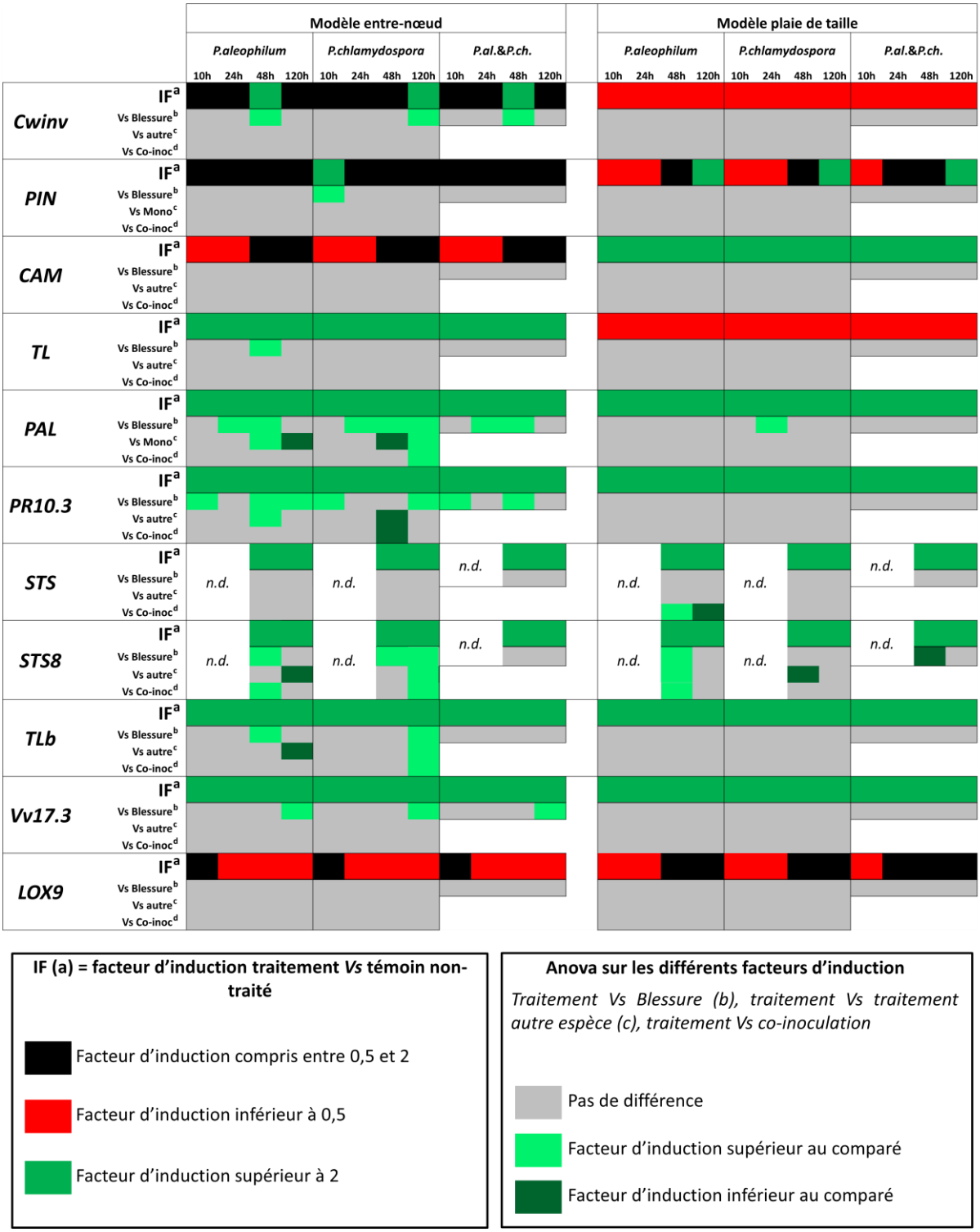


Figure 38 Synthèse de l'induction relative des gènes de défense du bois de la vigne en réponse à la blessure, P. aleophilum, P. chlamydospora et la co-inoculation des deux espèces 10h, 24h ; 48h et 120h après traitement en modèle entre-nœud et plaie de taille. Les lignes ***IF (a)*** *indiquent :* *les inductions biologiquement significatives >2,* *les repressions biologiquement significatives et* *les inductions comprises entre 0.5x et 2x, relativement à l'expression du témoin non-traité. Les différences statistiques d'induction entre les traitements par rapport* ***(b) Vs Blessure :*** *au témoin blessé ;* ***(c) Vs autres :*** *à l'autre espèce ;* ***(d) Vs co-inoc :*** *à la co-inoculation ont été déterminées à l'aide d'une ANOVA suivit du test post-hoc de Tukey (α=0.05).* *pas de différence entre les inductions,* *facteur d'induction supérieur à l'induction du traitement comparé,* *facteur d'induction inférieur à l'induction du traitement comparé.*

Deux gènes illustrent cette différence. Il s'agit des gènes *CAM* et *TL*. Le gène *CAM* a été fortement induit en modèle plaie de taille tandis qu'il a été réprimé par la blessure en modèle entre-nœud. Ce gène est associé à la signalisation de la reconnaissance du stress impliquant le Ca^{2+} chez la plante (Sanders et al. 1999; Ng and McAinsh 2003; Lecourieux et al. 2006). Les tissus en modèle plaie de taille étant plus verts, il se pourrait que les flux de calcium soient plus importants dans ce dernier plutôt que dans les tissus du modèle entre-nœud. Pour un même stimulus la signature Ca^{2+} varie suivant l'organe ou le tissu étudié (Lecourieux et al. 2006). L'expression du gène *CAM* permettrait de mettre en évidence cet effet. A l'inverse le gène *TL* a été induit par la blessure en modèle entre-nœud et réprimé en modèle plaie de taille. Ce gène appartient à la classe 5 de protéines PR, les protéines Thaumatin-like (Van Loon and Van Strien 1999). Ces protéines présentent des propriétés antifongiques et modifient l'intégrité de la paroi des champignons en créant des pores dans leurs membranes plasmiques. Certaines présentent également une activité inhibant les xylanases et les β-glucanases. Ces enzymes fongiques dégradent les hemicelluloses, composé principal des parois végétales, afin de procurer aux pathogènes des sucres (xylose ou glucose) (Datta et al. 1999; Monteiro et al. 2003). Une blessure dans l'entre-nœud induirait donc ce gène tandis qu'il serait réprimé dans les tissus blessés du modèle plaie de taille.

Le gène *PAL* est induit par la blessure quel que soit le modèle d'inoculation tandis que le gène *LOX9* est réprimé. Le gène *PAL* code une phénylalanine ammonia-lyase précurseur de l'acide salicylique (Jones 1984). Il semblerait que cette hormone de la défense soit impliquée dans la réponse à la blessure dans le bois. Il est surprenant d'observer que le gène *LOX9*, codant une lipoxygènase, soit réprimé. Chez *Arabidopsis* ces enzymes sont impliquées dans les étapes précoces de la voie du jasmonate (Turner et al. 2002; Thomma et al. 2001). Cette voie est associée à la réponse à la blessure chez cette plante modèle, or il semblerait que ce ne soit pas le cas du gène *LOX9* chez la vigne. Il semblerait que la blessure induise les gènes impliqués dans la défense contre les micro-organismes : les gènes *PR10* codant des RNAses dont les cibles sont mal connues (Castro et al. 2008), une autre thaumatin-like (*TLb*), deux stilbène synthases (*STS* et *STS8*) et *Vv17.3*.

D'autre part cette étude d'expression de gènes a révélé que le bois de boutures de Cabernet Sauvignon clone 15 percevrait de manière spécifique *P. aleophilum*, *P. chlamydospora* ou la co-inoculation de ces deux espèces de pathogènes par rapport au témoin blessé. Etant donné

que l'expression de onze gènes a été étudiée, la perception spécifique des champignons associés à l'esca par le bois de la vigne reste une hypothèse. Les répétitions en modèle entre-nœud étant plus homogènes, c'est l'étude de ce modèle qui a fait le plus ressortir cet effet en statistique. Le tissu en modèle plaie de taille étant plus vert, il est possible que la blessure masque la réponse de la plante à la perception des champignons. La cinétique d'expression du gène *PAL* illustre la mise en place de la perception sur les 120 h de la cinétique de défense. En modèle entre-nœud, seul la blessure a été perçue 10 hpi. Ensuite les plantes inoculées avec du mycélium ont induit d'avantage le gène *PAL* que le témoin blessé 24 hpi. Finalement la réponse de la plante dépendrait de l'identité du pathogène inoculé 48 h et 120 hpi. Les plantes répondent différemment en présence de *P. aleophilum* 48 hpi ou en présence de *P. chlamydospora* 120 hpi. Notons que 48 hpi le gène *PAL* est induit différemment suivant l'espèce de champignon présente et le témoin blessé.

Le gène *PIN* a été réprimé par la blessure en modèle plaie de taille 10 hpi. Or la présence de *P. chlamydospora* a induit ce gène en modèle entre-nœud au même point de cinétique. Le bois de l'entre-nœud de la vigne induirait précocement ce gène codant cette PR6 ayant des propriétés antimicrobiennes (Ryan 1978; Van Loon and Van Strien 1999) en réponse à *P. chlamydospora*.

Le gène *CWinv* a été induit différemment par la présence de *P. aleophilum* et la co-inoculation que par la blessure 48 hpi en modèle entre-noeud. En présence de *P. chlamydospora* ce gène a été deux fois plus induit que les témoins blessés 120 hpi. *CWinv* n'a pas été induit en modèle plaie de taille ou faiblement réprimé 120 hpi. Ce gène est exprimé au niveau de la paroi des cellules végétales et appartient à la famille des invertases pariétales. Ces enzymes hydrolysent les sucres transportés dans les vaisseaux afin de les rendre disponibles pour la cellule (Sherson et al. 2003; Roitsch et al. 2003; Fotopoulos et al. 2003). Cette famille de gènes est active dans les tissus « puits ». Il semblerait donc que la présence de mycélium dans la blessure en entre-nœud induise précocement (48 et 120 hpi) ce gène associé au puits par rapport à la blessure. Ce n'est pas le cas en modèle plaie de taille.

P. aleophilum a induit le gène *TL* quatre fois plus que le témoin blessé 48 hpi en modèle entre-nœud. Ce gène n'a pas été induit en modèle plaie de taille quel que soit le point de cinétique. Le gène *TLb* a présenté le même comportement que le gène *TL* 48hpi. *P. chlamydospora* a induit quatre fois plus *TLb* que les autres traitements dans l'entre-nœud 120 hpi. Les

Thaumathin-like présentent des propriétés antifongiques. Le bois de l'entre-nœud répondrait donc spécifiquement à la présence de *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* en induisant des gènes codant des protéines antifongiques par rapport au traitement mock. Le gène *TL* est fortement induit dans le bois de sarment présentant des symptômes de GLSD par rapport aux sarments de plantes asymptomatiques ou en apoplexie (Spagnolo et al. 2011). Notre étude n'a pas révelé d'induction précoce de ce gène liée à la présence de mycélium. Toutefois cette famille de gène pourrait être associée à la réponse du bois à l'esca.

L'expression du gène *PR10.3* varie également suivant la présence de *P. aleophilum* ou *P. chlamydospora*. Ce gène a été quatre fois plus induit par *P. aleophilum* que par *P. chlamydospora* ou le traitement mock 48 hpi en modèle entre-nœud. Le gène a répondu à la co-inoculation de la même manière. *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* ont induit le gène *PR10.3* par rapport au témoin blessé 120 hpi en modèle entre-nœud.

Les gènes codant les stilbène synthases ont également été induits par la présence de mycélium suivant le tissu inoculé. *STS* a été induit 6 fois plus en présence de *P. aleophilum* par rapport à la co-inoculation 48 hpi en modèle plaie de taille. L'effet inverse a été observé 120 hpi pour dans ce même tissu. La réponse de *STS* en modèle entre-nœud n'a pas mis en évidence d'induction spécifique à l'identité du champignon. *STS* est le seul gène de cette étude à avoir révélé une perception des pathogènes inoculés au niveau de la plaie de taille. Le gène *STS8* a été quatre fois plus induit par *P. aleophilum* que par la blessure, et deux fois plus que par la co-inoculation, en modèle entre-nœud 48 hpi. Ce gène a été induit par *P. chlamydospora* en modèle entre-nœud 120 hpi. Le point de cinétique 48h en modèle plaie de taille du gène *STS8* est remarquable. Globalement ce gène est induit entre 8 et 32 fois plus que le témoin non traité. Néanmoins, la co-inoculation a réprimé *STS8* d'un facteur 4 par rapport à *P. aleophilum* et d'un facteur 2 par rapport à la blessure. C'est l'unique cas observé où la perception d'un traitement a entraîné une répression d'un gène par rapport à la blessure. La présence simultanée des deux pathogènes a donc réprimé (48 hpi) un gène appartenant à la famille des stilbène synthase, dont la protéine participe à la synthèse de composés antifongique (Chong et al. 2009), par rapport à l'induction des plantes blessées ou inoculées avec *P. aleophilum*. Cette observation pose la question de la colonisation en synergie entre ces deux espèces souvent isolées ensemble dans du bois malade.

L'inoculation simultanée de *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* a été perçue par le bois de la vigne pour certain points de cinétiques. En modèle entre-nœud il s'agit des expressions des gènes *CWinv* 48 hpi, *PR10.3* 48 hpi, et *STS* 120 hpi. En modèle plaie de taille l'expression de *STS8* 120 hpi a montré cet effet. Etant donné qu'il s'agit de l'inoculation de deux plugs d'espèces de champignons différentes, il était inévitable d'inoculer une espèce en premier dans la blessure, puis la seconde. Il se pourrait que l'induction due à la co-inoculation suive l'induction observée chez le champignon inoculé en premier. Afin d'observer ce possible biais, *P. chlamydospora* a systématiquement été inoculé en premier lors de la co-inoculation avec *P. aleophilum*. La comparaison entre les inductions des gènes *PR10.3* et *STS8* illustre que la réponse à la co-inoculation est indépendante de l'ordre d'injection de pathogènes. *P. aleophilum* et la co-inoculation induisent deux fois plus le gène *PR10.3* 48 hpi en modèle entre-nœud tandis que *P. chlamydospora* et la co-inoculation répriment deux fois plus le gène *STS8* 48 hpi par rapport à *P. aleophilum* en modèle plaie de taille.

En conclusion le bois de la vigne serait capable de percevoir l'espèce de pathogène présente dans une blessure. Cet effet est ténu car seulement *PAL*, *PR10.3*, *STS8* et *TLb* ont été induits différemment par la présence de *P. chlamydospora* ou *P. aleophilum* pour certains points de cinétiques (Figure 38). Dans les autres cas où la présence d'un champignon a causé une induction, on ne peut pas vraiment parler de spécifité. En effet, l'induction de l'autre espèce est confondue avec celle de la blessure. Cependant la perception de l'une des espèces étudiées a été observée pour différents gènes rapport au témoin blessé, à différents points de la cinétique. L'ensemble de ces perceptions forme une signature propre à chaque espèce (Figure 38). Etendre cette étude à beaucoup plus de gènes permettrait de confirmer la spécificité de l'interaction entre la vigne et ces deux pathogènes.

3 DISCUSSION SUR LES INTERACTIONS PRECOCES ENTRE LA VIGNE ET LES CHAMPIGNONS ASSOCIES A L'ESCA

Les interactions précoces entre la vigne, *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* ont été étudiées suivant deux approches : une approche histologique et une approche moléculaire. La notion de précocité n'est pas la même suivant l'approche considérée. En histologie la colonisation précoce du champignon et la réponse précoce du bois de la vigne ont été étudiées 6 semaines

et 12 semaines après inoculation. En biologie moléculaire la réponse précoces des tissus de bois a été mesurée 10h, 24h, 48h et 120h après inoculation. Discuter les observations résultant de ces différentes investigations doit donc se faire avec prudence car l'échelle de temps est différente.

L'objectif de cette étude était de participer à la compréhension des événements précoces du pathosystème complexe de l'esca. La colonisation de *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* a été visualisée 6 et 12 semaines après inoculation de souches transformées exprimant la GFP. Les deux espèces n'ont pas colonisé la plante de la même façon. La colonisation était également différente suivant le tissu inoculé : une blessure en modèle entre-nœud ou en modèle plaie de taille. En modèle entre-nœud *P. aleophilum* coloniserait d'abord les fibres du xylème à 6 semaines, avant d'envahir les vaisseaux du xylème 12 semaines après inoculation. *P. chlamydospora* n'est présent que dans les vaisseaux du xylème 12 semaines après inoculation. La colonisation en modèle plaie de taille serait moins évidente pour ces pathogènes. *P. aleophilum* n'est pas parvenu à coloniser ce tissu 6 semaines après inoculation. A 12 semaines *P. aleophilum* s'est bien développé tandis que *P. chlamydospora* est resté au niveau de la zone d'inoculation. Les deux modèles d'inoculation présentaient des réponses du bois. L'intensité de la réponse à *P. aleophilum* semblait plus forte que la réponse à la blessure 6 semaines après traitement. La réponse associée à la perception du pathogène n'était plus discernable à 12 semaines pour *P. aleophilum*, et n'a pas été observée pour *P. chlamydospora*. Suite à l'étude histologique, il semblerait que les tissus impliqués dans l'interaction précoce vigne-champignons ne soient pas les mêmes pour ces deux espèces. D'autre par les tissus ne répondent pas de la même manière suivant le modèle d'inoculation. Finalement la réponse de la plante semble varier suivant la présence de *P. aleophilum* 6 semaines après inoculation.

Une approche moléculaire a donc été menée afin de conforter ces hypothèses, mais également de comprendre les mécanismes pouvant expliquer ces différences de colonisation ou de réponses suivant les champignons et le modèle d'inoculation. Onze gènes ont été étudiés en cinétiques formées par les points 10h, 24h, 48h et 120h après inoculation. L'étude de l'expression de ce groupe de gènes en réponse à la blessure a révélé que les tissus de l'entre-nœud ou du modèle plaie de taille répondent différemment. Les deux gènes marquant le plus cette différence étaient *CAM* et *TL*. *CAM* a été fortement induit par la blessure en modèle plaie de taille tandis que ce gène est réprimé en modèle entre-nœud. La calmoduline

est un senseur de flux de Ca^{2+}. La signature de ces flux affecte l'activité de la calmoduline (Lecourieux et al. 2006). Cette signalisation fait partie des premières étapes débouchant sur la spécificité de la reconnaissance des micro-organismes par les cellules de la plante. La signalisation intervient très tôt dans la réponse de la plante (Garcia-Brugger et al. 2006). Il est donc cohérent d'observer une induction forte à tous les points de la cinétique entre 10h et 120 hpi. Le gène *CAM* a été fortement induit par la blessure en modèle plaie de taille. Or c'est le modèle où la colonisation serait moins évidente pour *P. aleophilum* et *P. chlamydospora*. La capacité de signalisation suite à la blessure impliquant la calmoduline pourrait donc participer à la protection de la plaie de taille. Cet effet, s'il existe, n'est pas suffisant car la colonisation par *P. aleophilum* a été observée dans tous les modèles 12 semaines après inoculation.

Le gène *TL* est le second gène illustrant la différence de réponse à la blessure entre les deux modèles. *TL* a été induit en modèle entre-nœud et non-induit voire réprimé en modèle plaie de taille. Ce gène code une protéine PR5. Les PR5 ont des propriétés antifongiques (Van Loon and Van Strien 1999). L'induction de ce gène ne semble pas avoir d'impact sur la colonisation des champignons puisque le modèle entre-nœud a été colonisé. L'induction du gène n'est pas forcément synonyme de présence de la protéine dans le tissu. D'autre part cette protéine peut être inefficace voire servir de ressource pour les champignons dans le cas où ils auraient développé la capacité de les détoxiquer.

Le gène *LOX9* a été réprimé dans les tissus du bois quel que soit le modèle. La blessure réalisée dans ces modèles est importante. Il est donc surprenant de ne pas avoir de réponse, ou bien une répression, d'un gène impliqué dans la synthèse de l'acide jasmonique. Les gènes codant des lipoxygènases sont des marqueurs de la réponse à la blessure chez *Arabidopsis*. Il se pourrait donc que la voie de l'acide jasmonique ne soit pas sollicitée lors de la réponse à la blessure dans le bois de la vigne. Une autre hypothèse serait une forte induction constitutive masquant toute réponse induite. En effet le matériel végétal provient d'une bouture, elle-même issue d'une vigne mère taillée à de nombreuses reprises. L'expression du gène *LOX9* dans les témoins non traités était moins importante que celle du gène de référence, mais parmi les plus fortes par rapport aux autres gènes de l'étude. Enfin, la réponse impliquant la voie de jasmonate est associée au pathogène nécrotrophe, celle de l'acide salicylique aux

biotrophes (Thomma et al. 2001). Si la vigne suit ce schéma, il se pourrait donc que *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* soient des biotrophes.

Les gènes restants ont été induits par les différents traitements de l'étude. Celle-ci consistait à mesurer la réponse de chaque gène suite à l'inoculation de *P. aleophilum*, *P. chlamydospora*, la co-inoculation des deux espèces et le témoin blessé (mock), par rapport au témoin non traité. Ces comparaisons ont permis de mettre en évidence la spécificité de la réponse du bois de la vigne. Plusieurs gènes ont présenté à différents points de cinétique une expression variant en fonction des traitements. Le bois de la vigne serait donc capable de percevoir l'identité des pathogènes présents dans une blessure. La co-inoculation des deux champignons est également perçue par le bois de la vigne.

Parmi les gènes répondant différemment suivant la présence d'un pathogène, le gène *CWinv* est plus particulièrement intéressant. En effet, ce gène est induit par *P. aleophilum* 48 hpi en modèle entre-nœud tandis qu'il n'est pas induit en modèle plaie de taille. *CWinv* code une « Cell Wall invertase ». Ces enzymes pariétales hydrolysent les sucres transportés dans le phloème afin d'approvisionner la cellule en énergie (Sherson et al. 2003). L'induction de ces gènes est donc souvent observée dans des organes puits, y compris lors de modifications de la force de ces puits lors de la pathogénèse (Roitsch et al. 2003). Le bois de la vigne est un organe puit puisque les réserves en amidon dans les sarments permettent la reproduction par voie végétative (Putz and Mooney 1991). Cependant l'induction causée par la présence de *P. aleophilum* est deux fois plus forte que le niveau d'expression du témoin blessé. L'expression de ce gène dans le témoin blessé est proche de l'expression constitutive mesurée dans le témoin non-traité. La présence de *P. aleophilum* dans la blessure de l'entre-nœud induit un gène responsable de l'approvisionnement de la cellule en énergie. L'observation de la souche *P. aleophilum*::*gfp7* avait mis en évidence la présence de structures ovoïdes dans les tissus proches de la blessure pouvant être des grains d'amidon. Ces structures n'étaient cependant pas présentes dans les coupes colonisées par la souche sauvage. Cette énergie pourrait servir à la mise en place des défenses de la plante, mais également comme ressource pour le champignon.

Les stilbènes sont des composés de défenses importants et très étudiés chez la vigne. Les gènes *STS* et *STS8* sont induits par la blessure. D'autre part, ces gènes sont induits différemment par *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* à différents points de cinétique. Le

temps 48 hpi en modèle plaie de taille du gène *STS8* est remarquable. En effet c'est le seul pas de temps où la co-inoculation réprime un gène par rapport à la blessure, mais également par rapport à *P. aleophilum*. *P. aleophilum* induit quatre fois plus le gène *STS8* seul que lorsqu'il est co-inoculé avec *P. chlamydospora*. L'étude de l'expression de certains gènes permettrait donc de mettre en évidence l'hypothétique synergie entre ces espèces. Cette synergie n'est pas mise en évidence en microscopie 12 semaines après inoculation.

Le gène *PIN* est induit spécifiquement par *P. chlamydospora* 10 hpi. La réponse du bois pourrait donc être spécifique à des temps précoces. Le serait-elle à des temps très précoces ? Les premières tentatives d'étude d'expression de gènes ont été réalisées dans les premières heures suivant l'inoculation. Les variations causées par le stress de la blessure empêchaient toute conclusion 1 hpi et 5 hpi.

D'après l'étude histologique, *P. chlamydospora*::*gfp1* n'a pas colonisé la plaie 12 semaines après inoculation. Cependant, cette observation est contradictoire avec la quantification en qPCR plexor de l'ADN de la souche sauvage 9 semaines après inoculation. En effet, la souche sauvage semble s'être développée dans les tissus de la plaie de taille. Cette expérience était un contrôle afin de prouver que les souches sauvages se développent dans les plantes inoculée et que les sarments utilisés lors des différentes études étaient sains. Les résultats contradictoires entre le développement de *P. chlamydospora*::*gfp1* en microscopie et la quantification de l'ADN de la souche sauvage suggère une altération de la virulence de la souche exprimant la GFP à cause de la transformation. Pourtant, les souches ont une vitesse de développement similaire sur boite. Un gène essentiel à la virulence peut avoir subi un « knock-out » ou une mise en silence. Localiser la zone où l'intégration du gène codant la GFP à eu lieu permettrait de connaître le gène affecté. La protéine prédite pourrait également être connue car le génome de *P. chlamydospora* est disponible (Antonielli et al. 2014)

Chapitre IV : Proposition de moyens de lutte contre l’esca

1 PROPOSITION D'UN MODELE DE CRIBLAGE DES AGENTS DE BIOCONTROLE DES MALADIES DU BOIS DE LA VIGNE EN LABORATOIRE

1.1 GENERALITES

Les maladies du bois de la vigne résultent d'un pathosystème complexe où de nombreuses espèces de microorganismes interagissent durant de nombreuses années. L'expression des symptômes tels qu'ils existent au vignoble n'a jamais été reproduite en laboratoire. Ce type d'étude demanderait entre 10 et 30 ans d'expérimentation. D'autre part, l'apparition des symptômes est extrêmement variable suivant le contexte pédoclimatique de la parcelle. Pour cela, les expériences au vignoble afin de tester des moyens de lutte sont difficilement réalisables.

Ainsi, développer un modèle de criblage en laboratoire permettrait de tester divers produits (éliciteurs, agents de contrôle biologique ou chimique) en quelques mois au lieu de quelques années. La quantification de l'ADN des champignons en biologie moléculaire permet de suivre la cinétique de développement des pathogènes, et donc de mesurer l'efficacité des produits sur le développement de micro-organismes associés aux maladies du bois. Ce modèle, accompagné de quelques résultats obtenus en testant des éliciteurs, est décrit dans le chapitre de livre ci-après.

1.2 PUBLICATION N°3: A MODEL FOR BIOLOGICAL CONTROL STUDIES OF GRAPEVINE TRUNK DISEASES UNDER LABORATORY CONDITIONS

R. PIERRON, J. POUZOULET, A. MEZIANE, N. MAILHAC AND A. JACQUES*

Université de Toulouse, Equipe Vins Viticulture et Œnologie, Département des sciences agronomiques et agroalimentaires, INP-EI Purpan, 75 voie du T.O.E.C. BP57611, 31076 Toulouse cedex 3, France.

**alban.jacques@purpan.fr*

Eds S. COMPANT and F. MATHIEU, CABI publishing

INTRODUCTION

The etiology of Grapevine Trunk Diseases (GTD) is poorly understood (Mugnai et al., 1999; Larignon et al., 2009; Lecomte et al., 2012; Bertsch et al., 2013; Surico, 2001). Several fungal species are associated with decay in or discoloration of the wood of grapevine trunks (Mugnai et al., 1999; Lecomte et al., 2012). Nevertheless esca-associated fungi are also present in healthy wood independently of foliair symptom expression (Bruez et al., 2014). To date there is no resistant cultivar, however tolerance was observed according to foliar symptom expression in field conditions (Grosman and Doublet, 2012). This cultivar tolerance may be related to xylem vessels dimension (Pouzoulet et al., 2014), which seems to condition grapevine-microbe interactions. These interactions are poorly described (Bertsch et al., 2013), especially their molecular aspects.

Phytopathogens as *Phaeomoniella chlamydospora* (Gams, Crous, Wingfield & Mugnai) are often described as colonizers of the xylem vessels (Del Rio et al., 2001; Surico et al., 2008; Landi et al., 2012). This colonization is associated with the presence of fungal secreted elements such as naphthalenone pentaketides (Abou-Mansour et al., 2004; Andolfi et al., 2011; Bruno and Sparapano, 2006a) or exopolysaccharides (Bruno and Sparapano, 2006a;

Bruno and Sparapano, 2006c; Andolfi et al., 2011), which are detected in xylem sap (Bruno *et al.*, 2007; Bruno and Sparapano, 2006b). The genome of *P. chlamydospora* is now available (Antonielli et al., 2014) and will be helpful to study the regulation of peptides involved in the virulence of this species. Infection may originate from the soil (Retief et al., 2006; Gubler et al., 2004; Mori et al., 2001), *via* aerial dispersal (Larignon et al., 2009), insect vectors (Rooney-Latham and Eskalen, 2005) or by contamination during the nursery processes (Retief et al., 2006; Waite and Morton, 2007; Halleen et al., 2003) and during vineyard management (Mugnai et al., 1999). However if all cuttings received the same care, some will present foliar or apoplectic Esca/BDA symptoms whereas other individuals may remain healthy for their entire life span (Hofstetter et al., 2012).

Pathogenic fungi considered as pioneers of grapevine trunk colonization are general opportunists of wounding injuries (Mostert et al., 2006). The contamination may occur in the aboveground or belowground tissues of *Vitis vinifera* L. and visible symptoms of wilting could appear in leaves after 30 years of incubation in the trunk (Mugnai et al., 1999; Larignon et al., 2009; Lecomte et al., 2012). Consequently the model selected for biological control studies is a complete plant, allowing several combinations of treatments according to the different plant compartments.

This section proposes a model to investigate interplays structuring the microbial ecology in the trunk of *Vitis vinifera* L. with a special emphasis regarding the biological control of *Phaeomoniella chlamydospora*. A model was elaborated with cutting plants. The aim of the "pruning model" was to develop a quick and easy method to test the effect of any compounds to enhance defense and resistance of grapevine facing fungal agents associated with GTD. Plant defense responses were studied, following different elicitors treatments, by measuring induction of several genes in trunk tissues by quantitative Reverse Transcriptase PCR. Secondly the development of *Phaeomoniella chlamydospora* was quantified 15 days post inoculation and compared to macroscopic observations. By using the model developed in this study, molecular tools allowed also to observe the impact of elicitors on fungal performance even though wood discoloration or necrosis had not yet appeared.

MATERIAL AND METHODS

Fungal isolates.

The reference strain of *Phaeomoniella chlamydospora* (CBS239.74), deposited in the CBS fungal bank (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Nertherlands), was grown on a PDA medium (MERCK, Germany), at 26°C in the dark.

Grapevine cuttings.

Vitis vinifera L. cv. Cabernet Sauvignon (clone 15) canes from mother vines located near Gaillac (France, 43°.939246'N; 1°.968121'E) were cut in order to obtain cuttings with three dormant buds. Plant material presenting bark injuries and wood discoloration were rejected. Cane pieces of similar lengths and diameters were surface sterilized with a bath of tap water containing 10 ml of 2.5% bleach water (1min), and then the plants were rinsed 3 times with normal tap water. The cuttings were then immersed in a bath of Cryptonol® (0.05%, Chauvin, France) overnight at 4°C. The following day, cuttings were removed from the bath and washed 3 times with tap water. Cuttings were then placed in autoclaved moist glass-wool (121°C, 15min) in plastic cases, covered with film, and placed under a 16h day/8h night light cycle at 28°C for two weeks in order to induce bud breaking and rooting. After two weeks, the most similar plants were selected and planted in pots containing a soil mixture consisting in turf /river sand/perlite (1:1:1) that have been autoclaved twice at 120°C for 15 min before that the root system grow. Plants were then watered every two days with sterile tap water.

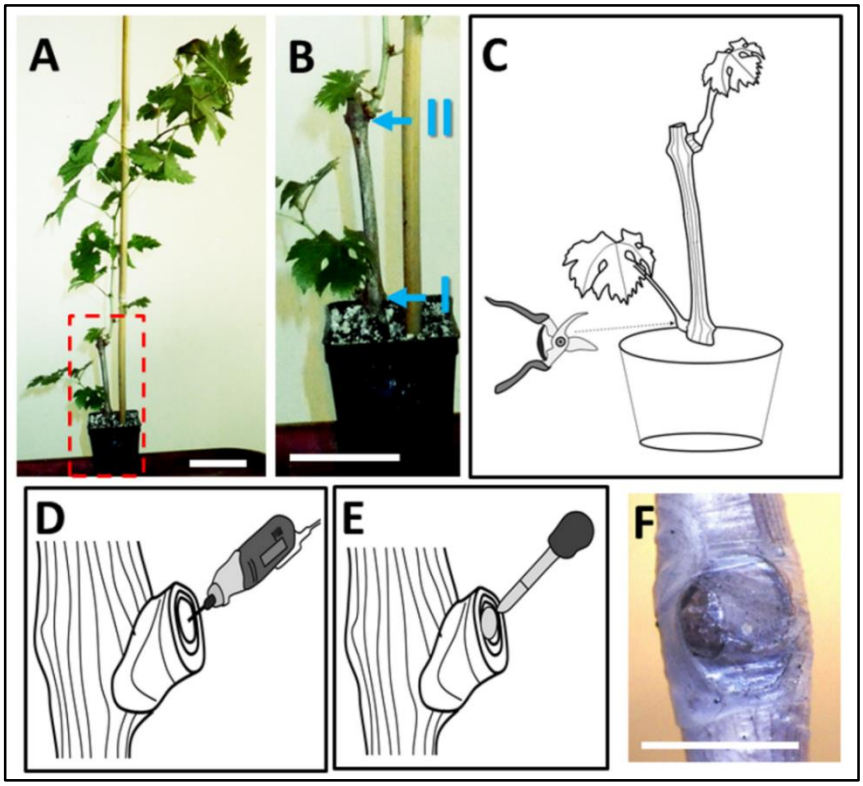


Figure 1. *"The pruning model".* ***A.*** *Three-weeks old plant in soil showing 2 developed branches.* ***B.*** *Closer view of the plant showing branches I and II.* ***C.*** *The branch I is pruned using a commercial clipper.* ***D.*** *A hole of 3mm large and1mm deep is performed using a drill.* ***E.*** *The tested compound and/or fungal spores are deposited in the hole.* ***F.*** *The wound after treatment is then protected with parafilm till day of sampling.Scale bars: 5 cm (A and B), 1 cm (F).*

Grapevine treatments.

The pruning wound model consists in cutting branch I (Figure 1A, 1B), then wounding damage receives the elicitor and or the phytopathogenic agent. To do so, the area surrounding branch I was surface sterilized with ethanol 80% on a tissue. The blades of a clipper were surface sterilized with ethanol 80% before cutting branch I near the trunk (Figure 1C). A small 1mm depth hole is then realized in the wounding damage with a 3mm driller surface sterilized with ethanol 80% (Figure 1D). This operation allows maintaining any solution applied to the injury longer enough. Then elicitor solution was deposited in the hole: 10µL of chitosan (2% in sterile water), laminarin (1g/L in sterile water) or chitin (2% in sterile water). The control plants were damaged treated with 10 µL of sterile water. Next optional treatment corresponded to a deposit of 10 µL spores solution of *Phaeomoniella chlamydospora* (10^6 spores/mL) in PBS 10mM pH7.2 (Figure 1E) or 10 µL of PBS 10mM pH7.2. The wound was protected by parafilm till harvest (Figure 1F). Wood tissues were harvested as follow. The piece of wood corresponding to 5mm up the wound and 5mm down the wound were obtained using surface sterilized blades with ethanol 80%. The samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

RNA extraction of treated trunk section.

Trunk sections containing the pruning wound were ground in liquid nitrogen using a mortar grinder Retsch MM300 (60 sec, 25 oscillations per second, twice, Retsch, Germany) in a 35ml stainless steel grinding jar (Retsch, Germany) with 20mm stainless steel balls (Retsch, Germany). The powder (1g) was incubated at 65°C in a RNA extraction buffer (CTAB 2%, PVPP 2%, Tris 300mM, EDTA 25mM, NaCl 2M, pH=8, 2% β-Mercaptoethanol). A half volume of a phenol/chloroform/isoamyl alcohol solution (25:24:1) was added and the mixture was then incubated on ice. The mixture was centrifuged and the supernatant was mixed with 0.6 volume of isopropanol and 0.1 volume of Na-Acetate (pH5.2) in a new tube. Samples were then stored at -80°C overnight. Then they were centrifuged until formation of a RNA pellet in the bottom of the tube. This pellet was dissolved in 1.5ml of RLT extraction buffer supplied by manufacturer (RNeasy plant mini Kit, Qiagen, USA) and 0.5ml ethanol. The subsequent steps were performed using buffers, materials and the protocol supplied with the RNeasy plant mini Kit. The final elution volume was 50µl. Samples were stored at -80°C. Total RNA was then quantified by Optical Density measurement using a Biophotometer plus® (Eppendorf AG, Germany). The absence of contaminating genomic DNA was insured by a DNase reaction (1u/l,30min at 37°C, DNase I, RNase free kit, Fermentas, Canada) and checked by a PCR test with the total RNA extract as a template and primers of the reference gene EF1α (Table1). The PCR products were then loaded in TAE/agarose gel (1.5% agarose 40mM Tris 20mM acetatic acid and 1mM EDTA, pH8.0). DNA was visualized via ethidium bromide staining under UV light.

RT-qPCR analysis of RNA from treated trunk section.

RT-PCR amplifications were performed using the Maxima® First strand cDNA synthesis kit for RT-qPCR (Fermentas, Canada), starting from 1µg of total RNA. cDNA synthesis was performed at 50°C for 60 min and then at 70°C for 15 min.

PCR experiments were conducted with an ABI 7500 Real-Time PCR cycler (Applied Biosystem, USA), using ABI SDS software v.1.4 with default setting. The cycling program was: (i) an initial denaturation step at 95°C for 5 min, (ii) 40 cycles of 5 s at 95°C for denaturation, followed by 35 s at 65°C for both annealing and extension, and (iii) an additional melting analysis of 40 min was performed from 60 to 95°C. Primer sequences used are indicated in Table 1.

Table 1. Primers sequences of *Vitis vinifera* L. defense related genes used in this study.

Gene	Primer sequence	Reference
EF1-α	F 5′-GAACTGGGTGCTTGATAGGC-3′ R 5′-AACCAAAATATCCGGAGTAAAAGA-3′	(Terrier et al., 2005)
Glu1	F 5′-TACCTCTTTGCCATGTTTGATG-3′ R 5′-AGTACTTCGGCTGTTTGTTTGG-3′	(Belhadj et al., 2006)
PIN	F 5′-GCAGAAACCATTAAGAGGGAGA-3′ R 5′-TCTATCCGATGGTAGGGACACT-3′	
Chit3	F 5′-AGATGGCATAGACTTCGACA-3′ R 5′-TGATGCTGTGGTCAAAGTAC-3′	(Busam et al., 1997)
LOX	F 5′-CTGGGTGGCTTCTGCTCTC-3′ R 5′-GATAAGCCGCAGATTCATGC-3′	(Aziz et al., 2003)
PR10.1	F 5′-CGTTAAGGGCGGCAAAGAG-3′ R 5′-GCATCAGGGTGTGCCAAGA-3′	(Robert et al., 2001)

DNA extraction of treated trunk section.

Samples were lyophilized for 24 hours in a Heto C110 lyophilisator (Kalisto, France) and ground at room temperature using a Retsch MM300 (60 sec, 25 oscillations per second, twice, Retsch, Germany) in a 35ml stainless steel grinding jar with 20mm stainless steel balls. The powder was incubated at 65°C in a DNA extraction buffer (CTAB 2%, PVPP 2%, Tris 100mM, EDTA 20mM, NaCl 1.4M, pH=8, 5µl β-Mercaptoethanol, 5µl RNAse A Qiagen). A half volume of a chloroform/isoamyl alcohol solution (24:1) was added and the mixture was incubated on ice. The mixture was then centrifuged and the supernatant was mixed with AP2 buffer from the DNeasy plant mini Kit (Qiagen, USA). The subsequent steps were performed using buffers, materials and the protocol supplied with the DNeasy plant mini Kit. The final elution volume

was 50µl. Samples were stored at -20°C (as described in Pouzoulet *et al.*, accepted with modifications).

PCR assays for quantification of *Phaeomoniella chlamydospora* in treated plants.

Reactions were carried out in a final volume of 25 µl, and reaction mixes contained 12,5 µl of 2X Plexor™ Master Mix (Promega, USA). Experiments were conducted with an ABI 7500 Real-Time PCR cycler (Applied Biosystem, USA), using ABI SDS software v.1.4 with default setting. Cycling program consist in: (i) an initial denaturation step at 95°C for 5 min, (ii) 40 cycles of 5 s at 95°Cfor denaturation, followed by 35 s at 65°Cfor both annealing and extension, and (iii) an additional melting analysis of 40 min was performed from 60 to 95°C. Plexor™ Analysis Software version 1.5.6.2 (Promega, USA) was used for data analysis (as described in Pouzoulet *et al.*, accepted with modifications).

RESULTS

The "pruning model"

Principles. In controlled conditions we generated pruning damage on a 3-eyes grapevine cutting. Then we treatedplants with tested molecule(s). Finally the wound was contaminated with a known amount of fungal spores involved in GTD. Within weeks, effects on defense and on induced resistance were analyzed *via* molecular tools.

As mentioned, the cuttings containing 3 eyes were placed in autoclaved rock wool until budding occurs and roots are sufficiently formed. Then they can be placed in a pot containing sand, perlite and peat. Plants were watered every two days. The first eye formed the root system of the young grapevine whereas the two others developed branches (I and II) (Fig.1A and B). Despite the apical dominance of branch (II), the lower branch (I) developed sufficiently and could be removed, thus mimicking a pruning site (figure C). The pruning wound could then receive fungal strain and their corresponding controlling agent to be evaluated (Fig.1D, E and F).

Elicitors effect on Vitis vinifera L. cv. Cabernet-Sauvignon and on Phaeomoniella chlamydospora development

Several molecules may induce plants defense and therefore may protect the plant either by pre-inducing or by priming the defense. To illustrate our model we conducted a study by using

three molecules having elicitor or plant growth-promoting properties: chitosan (Trotel-Aziz et al., 2006), laminarin (Aziz et al., 2003) and chitin (Zhang et al., 2002). Phenotypic changes induced by those compounds and their impact on the early development of *Phaeomoniella chlamydospora* were investigated.

Defense genes expression study.

The figure 2 represents the induction factors of genes associated with defense pathway in grapevine wood (*Glu1*: glucanase ; Belhadj et al., 2006, *PR10.1*: pathogenesis related protein ; Robert et al., 2001, *Chit3*: chitinase ; Busam et al., 1997, *LOX*: lipoxygenase ; Aziz et al., 2003, *PIN*: protease inhibitor ; Belhadj et al., 2006). A pruning wound was treated with chitosan, laminarin or chitin. In order to identify the induction only due to the elicitor treatment, we compared the induction of a damaged plant receiving the elicitor to the induction in a damaged plant receiving water only. In each case the induction of the gene of interest was relative to the induction of a reference gene. Our chosen reference was EF1α, a well-known housekeeping gene recently published as one of the most relevant reference genes for expression studies in treated wood with *P. chlamydospora* (Terrier et al., 2005; Borges et al., 2014).

The kinetic of analysis can be modulated. In the case of pruning we chose 2 and 5 days post inoculations which may correspond to the time laps between the pruning and the vinedressers' second passage to treat their plants.

Fig. 2A showed induction factor of plant treated with chitosan. *LOX* gene is strongly induced 5dpi. Plant receiving laminarin (Fig. 2B) induces *Chit3* and strongly induces *LOX* 5dpi. Finally Fig 2C presents a strong induction of both *LOX* and *Chit3* 2dpi and 5dpi. All three products strongly induce *LOX* gene 5dpi, which is a marker of jasmonic acid pathway. *PR10.1*, *Glu1* and *PIN* genes in these entire treatments are not clearly induced (Fig. 2).

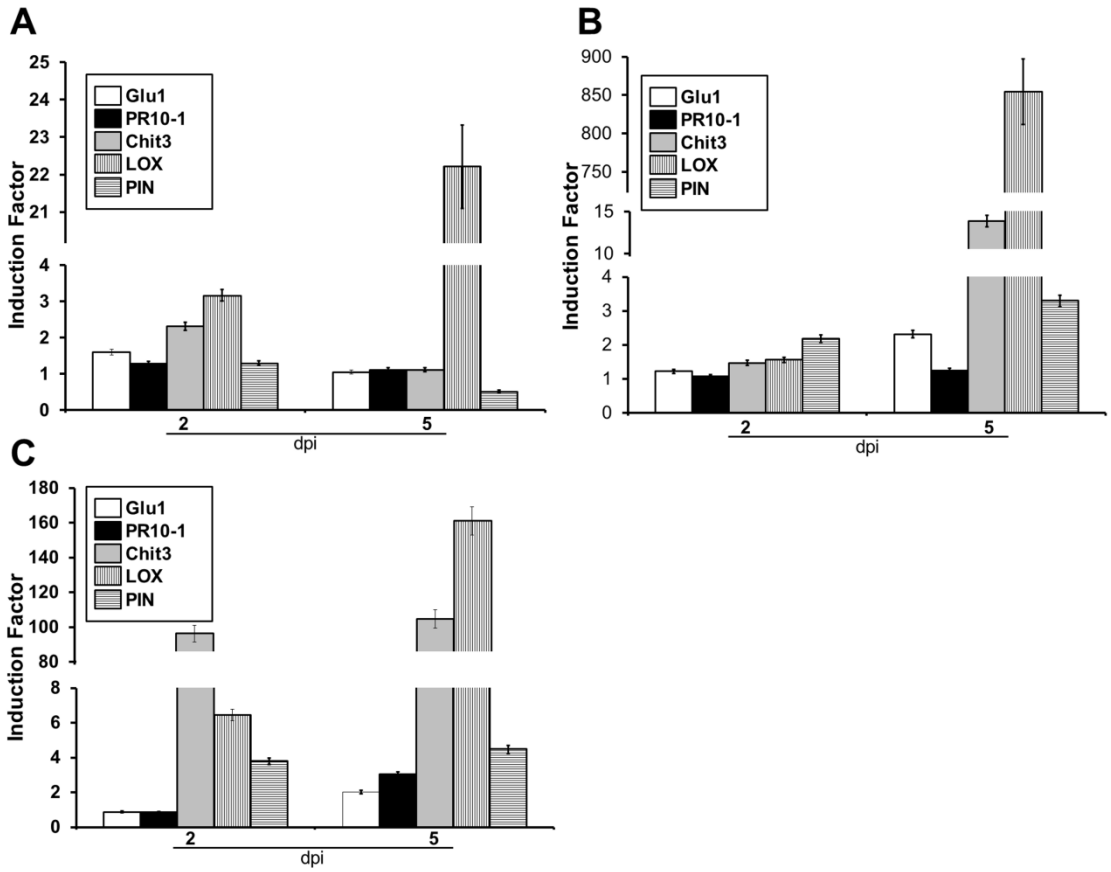


Figure 2. *Defense genes are induced by elicitor treatments. Induction factors are calculated via* $2^{-\Delta\Delta Ct}$ *method with EF1*α *as reference gene and water as reference treatment for time point of induction. Glu1 is glucanase 1, Chit3 is chitinase 3, LOX is lipoxygenase.* ***A.*** *Chitosan (2%).* ***B.*** *Laminarin (1g/l).* ***C.*** *Chitin (2%).*

Quantification of fungal development.

In our group we developed a molecular detection method allowing simultaneous detection and quantification of *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora.* This molecular technique is based on the Plexor™ technique of multiplex quantitative Polymerase Chain Reaction (Pouzoulet *et al.*, accepted with modifications).

Fungal development is largely hampered by the chitosan treatment compared to the water control (Fig. 3A). It is noticeable that induction of defense related genes does not correlate automatically with resistance. Firstly, this means that other genes expressions that were not monitored may participate in resistance to *Phaeomoniella chlamydospora* to a larger extend, and secondly, that the pathogen performance is essential to attest resistance. Another strong point of this model is its sensitivity. The impact of a compound on fungal performance is observable 15dpi whereas nothing can be distinguishable in macroscopic observation of plant sections (Fig. 3 B).

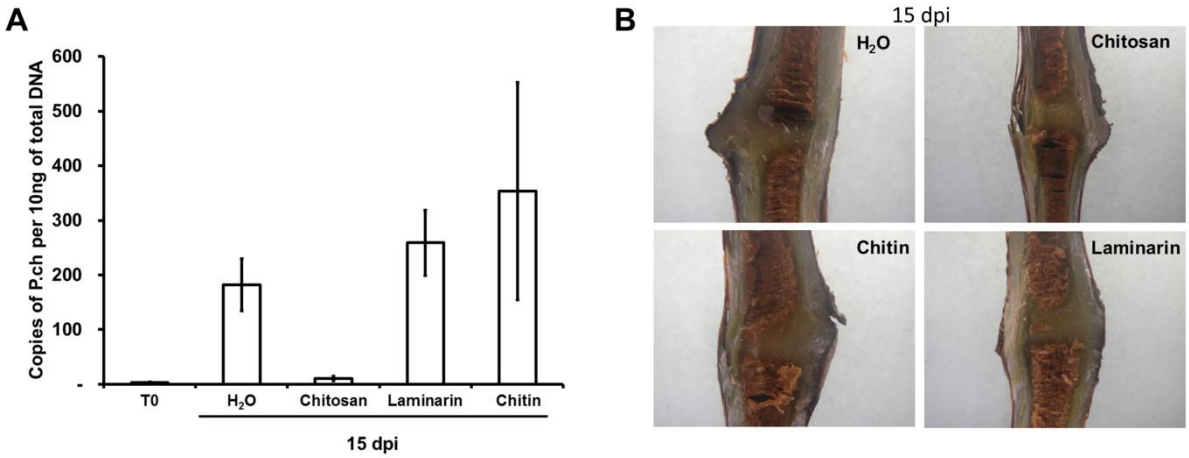


Figure 3. *Effect of elicitor pre-treatment on Phaeomaniella chlamydospora development.* ***A.*** *Number of copies of Phaeomoniella chlamydospora per 10 ng of total extracted DNA from pruned tissues 15 days post treatment with 10000 spores of Phaeomoniella chlamydospora.* ***B.*** *Macroscopic view of pruning wounds 15 days post-inoculation.*

DISCUSSION

GTD are widely sprayed and represent a major treat for vinedressers. Nevertheless the microbial ecology of grapevine trunk is poorly understood (Bertsch et al., 2013). Here we conducted a grapevine-microbe interaction study on young plants. This model allows to measure gene expressions at the site of treatment with an elicitor. cDNA synthesis is performed from mRNA and quantified by RT-qPCR. Gene induction is one of the earliest observations of plant responses upon a challenge. It results in phenotypic changes that may affect phytopathogens or other members belonging to the plant-associated community (Utsumi et al., 2010). Because the wood is a difficult tissue to handle in molecular biology, trunk defense regulation is unclear. It is stimulating to observe responses in wood tissue 2dpi and 5dpi for defense related genes. Thus the wood appears to be active and this observation raises several interrogations, notably the kinetics of trunk response, its specificity and impact on Esca/BDA associated fungi. Responses differ according to the elicitors employed and give promising results on a model easy to obtain and to maintain under laboratory conditions. An *in vitro* study proposed a model to characterize effector secreted by *Botryosphaeriacea* species (Bénard-Gellon et al., in press) which could be interested to test *in planta* with the techniques presented in this chapter.

In addition this system allows measuring the resistance resulting from defense induction, *i.e.* the impact of plant phenotypic changes due to the elicitor on pathogenic fungi. In this case

the development of *Phaeomoniella chlamydospora* was monitored by qPCR (Pouzoulet et al., accepted with modifications). *Phaeomoniella chlamydospora* shows less development at 15dpi in plants induced by a pruning damage with chitosan than in pruned plants receiving water control. More interestingly the impact of elicitation using 3 well-known compounds was assessed even though no wood discoloration or necrosis had appeared yet. This sensitivity implies an important economy of time in screening processes. In addition this model is easily adaptable to other Esca/BDA associated fungi (*Neofusicoccum parvum*, *Diplodia seriata*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Eutypa lata*), elicitors or BCA (Biocontrol agent).

Plants are surface sterilized but far to be sterile. We may wonder if other micro-organisms may interfere in the relation among elicitors, and the pathogen. Probably so, and it may explain why several biological agents most efficient in the laboratory are not effective in field experiments, as observed in the control of soil born plant pathogenic fungi (Hubbard et al., 1983). That is why we only screened for pathogens targeted by the study in vineyards. The entire native microflora that inhabits the trunk is present in our model. This microflora corresponds to the flora of a one year old cane at the time of pruning, *ie* during the dormancy. Consequently this laboratory model is especially dedicated to nurseries concerns: to clarify infection processes and to understand defense mechanisms in woody cane in order to optimize them.

To conclude the pruning wound model that we developed here enabled to study the impact of elicitor and/or biological control agent (BCA) on grapevine defense regulation in wood. Furthermore this model allows us to follow consequences on fungal pathogen development associated with early steps of GTD. By combining molecular biology techniques (RT-qPCR and qPCR), large screening of elicitors/BCA can be realized and therefore can inform on the efficiency to control pathogens and the mechanism underlying this control.

ACKNOWLEDGMENTS

Romain PIERRON is supported by INP-EI PURPAN and « Région Midi-Pyrénées ». Jérôme POUZOULET was supported by Loire Vini Viti Distribution (LVVD, Z.A. du Landreau, 49610 Mozé sur Louet, France).We are grateful to Christina TOMA for English assistance.

REFERENCES

Abou-Mansour, A., E. Couché,R. Tabacchi (2004) Do fungal naphthalenones have a role in the development of esca symptoms? Phytopathol. Mediterr. 43:75–82.

Andolfi, A., L. Mugnai, J. Luque, G. Surico, A. Cimmino, A. Evidente (2011) Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. Toxins 3:1569-1605.

Antonielli, L., S. Compant, J. Strauss, A. Sessitsch, H. Berger H (2014) Draft genome sequence of *Phaeomoniella chlamydospora* strain RR-HG1, a grapevine trunk disease (esca)-related member of the Ascomycota. Genome Announc. 10:2(2). pii: e00098-14. doi: 10.1128/genomeA.00098-14.

Aziz, A., B. Poinssot, X. Daire, M. Adrian, A. Bézier, B. Lambert, J.-M. Joubert,A. Pugin (2003) Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. Mol. Plant-Microbe Interact. 16:1118-1128.

Belhadj, A., C. Saigne, N. Telef, S. Cluzet, J. Bouscaut, M.-F. Corio-Costet, J.-M. Merillon (2006) Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. J. of Agric. Food Chem. 54:9119-9125.

Bénard-Gellon, M., S. Farine, ML. Goddard, M. Schmitt, E. Stempien, F. Pensec, H. Laloue, F. Mazet-Kieffer, F. Fontaine, P. Larignon, J. Chong, C. Tarnus, C. Bertsch (2014) Toxicity of extracellular proteins from *Diplodia seriata* and *Neofusicoccum parvum* involved in grapevine Botryosphaeria dieback. Protoplasma doi: 10.1007/s00709-014-0716-y

Bertsch, C., M. Ramírez-Suero, M. Magnin-Robert, P. Larignon, J. Chong, E. Abou-Mansour, A. Spagnolo, C. Clément, F. Fontaine (2013) Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. Plant Pathol. 62:243-265.

Borges, A. F., C. Fonseca, R. B. Ferreira, A. M. Lourenço, S. Monteiro (2014) Reference gene validation for quantitative RT-PCR during biotic and abiotic stresses in *Vitis vinifera*. PLoS One 1:9(10):e111399 doi:10.1371/journalpone.0111399

Bruez E., J. Vallance, J. Gerbore, P. Lecomte, JP. Da Costa, L. Guerin-Dubrana, P. Rey (2014) Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of esca leaf-symptomatic and asymptomatic vines. PLoS One 9(5):e95928 doi: 10.1371/journal.pone.0095928.

Bertsch, C., M. Ramírez-Suero, M. Magnin-Robert, P. Larignon, J. Chong, E. Abou-Mansour, A. Spagnolo, C. Clément, F. Fontaine (2012) Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. Plant Pathol.In press (Doi: 10.1111/j.1365-3059.1012.02674.x).

Bruno, G., L. Sparapano (2006a) Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: I. Characterization of secondary metabolites in culture media and host responses to the pathogens in calli. Physiol. Mol. Plant Pathol. 69:209-223.

Bruno, G.,L. Sparapano (2006b) Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: II. Characterization of biomolecules in xylem sap and leaves of healthy and diseased vines. Physiol. Mol. Plant Pathol. 69:195-208.

Bruno, G.,L. Sparapano (2006c) Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: III. Enzymes produced by the pathogens and their role in fungus-to-plant or in fungus-to-fungus interactions. Physiol. Mol.Plant Pathol. 69:209-223.

Bruno, G., L. Sparapano, A. Graniti (2007) Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: V. Changes in the chemical and biological profile of xylem sap from diseased cv. Sangiovese vines. Physiol. Mol. Plant Pathol. 71:210-229.

Busam, G., H.H. Kassemeyer, U. Matern (1997) Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. Plant Physiol. 115:1029-1038.

Eskalen, A., S. Rooney-Latham, W. Gubler (2007) Protection of grapevine pruning wounds against esca and young esca pathogens. Phytopathology 97:S33-S33.

Gubler, W. D., K. Baumgartner, G.T. Browne, A. Eskalen, S.R. Latham, E. Petit, L.A. Bayramian (2004) Root diseases of grapevines in California and their control. Australasian Plant Pathol. 33:157-165.

Halleen, F., P.W. Crous, O. Petrini (2003) Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. Austral. Plant Pathol. 32:47-52.

Hofstetter, V., B. Buyck,D. Croll (2012) What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? Fungal Diversity 54:51-67.

Hubbard, J.P., G.E. Harman, Y. Hadar (1983) Effect of soilborne *Pseudomonas* spp. on the biological control agent, *Trichoderma hamatum,* on pea seeds. Phytopathology 73:655-659.

Landi, L., S. Murolo,G. Romanazzi (2012) Colonization of *Vitis spp*. wood by sGFP-transformed *Phaeomoniella chlamydospora*, a tracheomycotic fungus involved in Esca disease. Phytopathology 102:290-297.

Larignon, P., F. Fontaine, S. Farine, C. Clément,C. Bertsch (2009) Esca and Black Dead Arm: two major actors of grapevine trunk diseases. C.R. Biologies 332:765-783.

Lecomte, P., G. Darrieutort, J.-M. Liminana, G. Comont, A. Muruamendiaraz, F.-J. Legorburu, E. Choueiri, F. Jreijiri, R. El Amil, M. Fermaud (2012) New insights into Esca of grapevine: the development of foliar symptoms and their association with xylem discoloration. Plant Dis. 96:924-934.

Mori, B., G. Surico,L. Mugnai, L. Troccoli (2001) *Phaeomoniella chlamydospora*-grapevine interaction: histochemical reactions to fungal infection. Phytopathologia40:400-406.

Mostert, L., J.Z. Groenewald, R.C. Summerbell, W. Gams,P.W. Crous (2006) Taxonomy and pathology of *Togninia* (Diaporthales) and its *Phaeoacremonium* anamorphs. Stud. Mycol. 54:1-113.

Mugnai, L, A. Graniti, G. Surico (1999) Esca (Black measles) and brown wood-streaking: Two old and elusive diseases of grapevines. Plant Dis. 83:404-418.

Pouzoulet, J., N. Mailhac, A. Jacques, X. Besson,M. Lummerzheim Tracking of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* using quantitative real-time PCR approach in young vine plants.Plant Dis.,accepted with modifications.

Retief, E., A. McLeod,P.H. Fourie (2006) Potential Inoculum Sources of *Phaeomoniella chlamydospora* in South African Grapevine Nurseries. Eur. J. Plant Pathol. 115:331-339.

Rio, J. Del, A. Gonzalez, M.D. Fuster, J.M. Botia, P. Gomez, V. Frias, A. Ortuño (2001) Tylose formation and changes in phenolic compounds of grape roots infected with *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* species. Phytopathol. Mediterr. 40:394-399.

Robert, N., J. Ferran, C. Breda, P. Coutos-Thévenot, M. Boulay, D. Buffard, R. Esnault (2001) Molecular characterization of the incompatible interaction of *Vitis Vinifera* leaves with *Pseudomonas Syringae* pv. *pisi*: expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein. Eur. J. Plant Pathol. 107:249-261.

Rooney-Latham, S., A. Eskalen (2005) Occurrence of *Togninia minima* perithecia in esca-affected vineyards in California. Plant Dis: 89: 867-871.

Surico, G. (2001) Towards commoly agreed answers to some basic questions on Esca. Phytopathol. Mediterr.40:487–490.

Surico, G., L. Mugnai,G. Marchi (2008) The Esca disease complex. In A. Ciancio and K. G. Mukerji, eds. Springer Netherlands, pp.119-136.

Terrier, N., D. Glissant, J. Grimplet, F. Barrieu, P. Abbal, C. Couture, A. Ageorges, R. Atanassova, C. Léon, J.-P. Renaudin, F. Dédaldéchamp, C. Romieu, S. Delrot, S. Hamdi (2005) Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. Planta 222:832-847.

Trotel-Aziz P., M. Couderchet, G. Vernet, A. Aziz (2006) Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. Eur. J. Plant Pathol.114:405-413.

Utsumi S., Y. Ando, T. Miki (2010) Linkages among trait-mediated indirect effects: a new framework for the indirect interaction web. Popul. Ecol.52:485-497.

Waite, H.E., L.U. Morton, (2007) Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material. Phytopathol. Mediterr.46:5–17.

Zhang, B., K. Ramonell, S. Somerville, G. Stacey, (2002) Characterization of Early, Chitin-Induced Gene Expression in Arabidopsis. Mol. Plant-Microbe Interact.15:963–970.

Le modèle plaie de taille permet de cribler des molécules ou des agents de biocontrôle contre l'esca en conditions de laboratoire. L'efficacité des produits testés est mesurée en quantifiant l'ADN des pathogènes dans le bois de la vigne. Il est ainsi possible d'estimer l'impact des molécules ou BCA testés sur le développement des pathogènes dans le bois. La réponse de la plante aux différents traitements est également étudiée afin de connaître leurs effets stimulateurs de défenses naturelles. Cette méthode devrait permettre le criblage d'un nombre important de produits en seulement quelques mois.

Suite au développement de ce modèle de criblage, différents moyens de luttes ont été testés. Parmi ceux-ci, l'eau ozonée a été l'un des plus prometteurs.

2 APPLICATION DES PROCEDES D'OZONATION POUR CONTROLER L'ESCA

2.1 GENERALITES

La vigne est l'une des cultures consommant le plus de pesticides. Les attentes sociétales demandent de développer de moyens de lutte respectant l'environnement et la santé. L'utilisation de l'ozone pour ses propriétés antimicrobienne est très répandue dans l'industrie agroalimentaire. L'eau ozonée possède un pouvoir oxydant deux fois plus puissant que l'eau oxygénée. D'autre part son avantage est d'être très peu rémanent. En effet la durée de demi-vie de l'ozone présent dans l'eau ozonée est d'une demi-heure. Ensuite l'ozone dissous dans l'eau se décompose en oxygène. L'objectif de cette étude était de savoir si l'emploi de l'eau ozonée pourrait limiter l'infection des plaies de taille par *Phaeoacremonium aleophilum*. Les propriétés fongicides de l'eau ozonée ont été testées (i) *in vitro* en exposant des conidies à différentes concentrations d'eau ozonées, et (ii) *in planta* sur des boutures de Cabernet-Sauvignon clone 15. Pour les tests *in planta*, l'ADN de *P. aleophilum* a été quantifié par qPCR. Les possibilités d'application de l'eau ozonée en viticulture sont présentées et discutées dans l'article suivant «. « ***In vitro* and *in planta* fungicide properties of ozonated water against the esca-associated fungus *Phaeoacremonium aleophilum*** ».

2.2 PUBLICATION N°4 : *IN VITRO* AND *IN PLANTA* FUNGICIDE PROPERTIES OF OZONATED WATER AGAINST THE ESCA-ASSOCIATED FUNGUS *PHAEOACREMONIUM ALEOPHILUM*.

Romain J.G. Pierron,[1, 2] Marielle Pages,[3] Christel Couderc,[1, 3] Stéphane Compant,[4] Alban Jacques,[1] and Frédéric Violleau[3]

[1] *Université de Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse – Ecole d'Ingénieurs de Purpan, Département des Sciences Agronomiques et Agroalimentaires, Equipe Vins Viticulture et Œnologie, 75 voie du TOEC, BP 57611, F-31076 Toulouse Cedex 03, France.*

[2] *Université de Toulouse, LGC UMR 5503 (CNRS/UPS/INPT), Dept BIOSYM, INP-ENSAT, 1 avenue de l'Agrobiopole, 31326 Castanet-Tolosan, France.*

[3] *Université de Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse – Ecole d'Ingénieurs de Purpan, Département Sciences Agronomiques et Agroalimentaires, UPSP/DGER 115, 75 voie du TOEC, BP 57611, F-31076 Toulouse Cedex 03, France.*

[4] *Bioresources Unit, Health & Environment Department, AIT Austrian Institute of Technology GmbH, 3430 Tulln, Austria.*

Submitted to *Scientia Horticulturae*

Abstract

Ozone could be used as a sanitary agent in the food and agricultural industries. The present study investigates whether ozonated water could be used to control the esca-associated fungus *Phaeoacremonium aleophilum*. The fungicide properties of ozonated water was firstly assessed *in vitro* by exposing spores to several concentrations of ozonated water (2.2, 4.5, or 13.5 g/m^3 of ozone dissolved into water) and observing the germination rate on plate. Secondarily an *in planta* approach was conducted on grapevine cuttings of cv. Cabernet Sauvignon clone 15. *P. aleophilum* was inoculated in pruning wounds which then received ozonated (4.5 g/m^3) or sterile water. *P. aleophilum* DNA was quantified by a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) 4 and 9 weeks post inoculation. The effect of ozonated water on plant-defense gene expression was monitored by reverse-transcriptase qPCR (RT-qPCR) 48 hours post treatment. The results indicate that ozonated water totally suppresses spore germination *in vitro*. In addition, at 9 weeks post inoculation, fungal development was significantly reduced by 50 % *in planta*. RT-qPCR analysis shows that ozonated water did not induce plant-defense-related genes 48 hours post treatment. The fungicide properties of ozonated water and the absence of gene induction *in planta* make ozonated water a promising candidate for limiting grapevine infection by *P. aleophilum* in nurseries.

Keywords: Ozonated water; fungicide; esca; *Phaeoacremonium aleophilum*; *Vitis vinifera* L.

Introduction

Modern agriculture is expected to supply food and protect the environment by using sustainable practices. A major pillar in the strategy of sustainable agriculture is to reduce pesticide use, which addresses both environmental and social concerns (Tilman et al. 2002). Fungicide inputs are highly important in grapevine production. In vineyards, pesticides have been or are currently applied to prevent the outbreak of vine pests or diseases, to control the surrounding flora, to increase grape yield, and to ensure wine quality (Leroux 2003; Pezet et al. 2004). A recent review (Compant et al. 2013) indicates that over 30 000 ton/year of fungicides or bactericides are currently sprayed on grapevines in France. In Europe, the International Organization of Vines and Wine established that 70 000 ton/year of fungicides are used on 3.8 million hectares dedicated to viticulture (http://www.endure-network.eu/). The development of innovative environment-friendly chemicals, for diseases for which no treatment exists, is highly desirable.

Among such diseases are grapevine trunk diseases (GTDs) such as eutypiose, esca, Black Dead Arm (Bertsch et al. 2013) or black-foot disease (Agusti-Brisach & Armengol 2013), which occurrence has increased dramatically over the last decade and is now one of the major threats for vineyards (Grosman & Doublet 2012). The comparison of several fungicides and bio-fungicides, such as those containing bio-control agents of the *Trichoderma* genus, as well as treatments or sanitation practices like the hot water treatment, reveals the difficulty of controlling GTDs (Halleen et al. 2007; Rego et al. 2009; Fourie & Halleen 2004). Other biological candidates for controlling GTDs are bacterial species (Compant et al. 2013). Overcoming the threat of esca and GTDs in general, however, will require a finely tuned combination of agricultural practices, sanitation, biological control, and chemical treatments.

Esca *sensus stricto* corresponds to the white rot that develops inside grapevine pith that suffer from a long-term infection (Mugnai et al. 1999). Plants whose trunks are heavily colonized may develop characteristic tiger-striped foliar symptoms of esca without the presence of white rot inside their trunks. Recently, the term “esca *sensus* leaf-stripe disease” has been coined to distinguish these two forms (Andolfi et al. 2011). Foliar symptoms probably originate from toxin transport from colonized wood to the leaves (Andolfi et al. 2011; Spagnolo et al. 2012) and/or from disruption of vessel sap flow (Lecomte et al. 2012). Since sodium arsenite was banned, no alternative treatment has been developed that efficiently controls esca. A recent review suggests that any single treatment cannot efficiently control this complex pathosystem (Bertsch et al. 2013). Several species of fungi have been isolated from the trunks of plants with symptoms of esca *sensus* leaf-stripe disease (Bruez et al. 2011; Bruez et al. 2014; Mugnai et al. 1999; Fischer 2006). *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* and *Fomitiporia mediterranea* are the main protagonists involved in this pathosystem (Bertsch et al. 2013). *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium*

aleophilum are clearly pathogenic when inoculating *in vitro* grapevine plants (Zanzotto et al. 2008).

Phaeoacremonium aleophilum is associated with esca in all wine-producing areas (Mostert 2005) and was isolated on grapevines in vineyards (Rooney-Latham et al. 2005a), in the air (Rooney-latham et al. 2005b), and in nurseries (Gramaje & Armengol 2011). The route of infection by *P. aleophilum* is not yet known but infection in nurseries via propagation material (Halleen et al. 2003), via pruning-wound infections (Eskalen et al. 2007; Aroca & Raposo 2009), and via soil inoculum in vineyards were investigated. Both in-nursery grafting and annual in-field pruning wounds cause significant injuries that could favor the entrance of esca-associated fungi such as *P. aleophilum*. The investigation of compounds that can control or limit the infection of pruning injuries is thus relevant for developing integrated pest management that controls esca.

Ozone appears to be an interesting alternative for controlling fungal pathogens and may be used to control the esca disease. Ozone dissolved in water (called “ozonated water” for convenience) is already used in the agriculture and food industry, notably for controlling post-harvest pathogens (Guzel-Seydim et al. 2004; Park et al. 2008; Miller et al. 2013). For example, dipping table grapes for 1 min in ozonated water decreases gray mold due to *Botrytis cinerea* (Smilanick et al. 2002). In horticulture, ozonated water can clean algae or residual pesticides from water pipes. Irrigating tomatoes with ozonated water increases growth rate (Ohashi-Kaneko et al. 2009), leaf area, and stem thickness, but does not impact stomata conductance, CO_2 assimilation, or fruit production (Graham et al. 2011). In addition, spraying ozonated water on cucumber leaves reduces the development of powdery mildew without causing any visible phytotoxicity (Fujiwara et al. 2009). In fact, no undesired effect has yet been attributed to the use of ozonated water on plants (Fujiwara et al. 2011). Interestingly, the application of ozonated water on *Chrysanthemum morifolium* cuttings promotes the formation and elongation of adventitious roots (Park et al. 2009). Ozone affects microbes directly and/or through free radicals. These compounds oxidize cell walls lipids of microorganisms and may also trigger cell-death signaling. An additional advantage of ozonated water is its low persistence. In fact, ozone quickly decomposes into dioxygen (Staehelln & Hoigné 1982): its half-life in distilled water is 20 to 30 minutes (Khadre et al. 2001). Ozone can also decompose into free radicals with a very short half-life. For example, depending on the temperature, pH, and concentration of free-radical scavengers (Staehelln & Hoigné 1982), some free radicals decompose within minutes in pure water. This variety of oxidative compounds could also explain the bactericide (Restaino et al. 1995; Young & Setlow 2004), anti-viral (Wedemeyer et al. 1978), and fungicide (Miller et al. 2013) effect of ozonated water.

To the best of our knowledge, no study has yet focused on the use of ozonated water to control grapevine colonization by fungal agents associated with GTDs. Therefore, the present

study investigates the *in vitro* sporicidal properties of ozonated water with respect to the germination of *Phaeoacremonium aleophilum*. The ability of ozonated water to early reduce the *in planta* colonization of *P. aleophilum* was measured by using molecular tools to quantify fungal DNA. In addition, we used a gene-expression study to investigate the response of grapevine to ozonated water.

Material and Methods

Fungal material

The strain *P. aleophilum* CBS 100398 was used for this study. It was maintained in the dark at 26 °C in a potato-dextrose-agar (PDA) medium (Merks, Germany). Spore solutions were prepared from four-week-old cultures. A plug of agar colonized by the fungus was placed in a 1.5 mL tube containing 1 mL of de-ionized autoclaved (121 °C, 15 min) water. The tube was vortexed and centrifuged (30 s, 5000 rpm) to precipitate conidia. The plug was removed from the tube. The conidia in solution were then counted by using a Malassez cell and diluted to the desired concentrations. Only freshly prepared spore solutions were used for this study.

Plant material

One-year-old canes of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon clone 15 were harvested in January 2013 in Gaillac (Midi-Pyrénées, France) and stored in the dark at 4 °C after a fungicide treatment consisting of a one hour bath containing 8-hydroxyquinoline sulfate (0.05% Cryptonol®, Chauvin, France). Canes were then divided into cuttings containing three dormant buds and were cleaned for 30 s in a 20 L water bath containing 10 mL bleach (2.6% active chloride) before being rinsed twice with fresh water. Next, the cuttings were stored overnight at 4 °C in a 0.05% Cryptonol solution. The cuttings were then cleaned three times in baths of tap water and planted in moistened autoclaved glass wool (121 °C; 15 min) contained in plastic trays. Cuttings were watered with autoclaved water (121 °C, 15 min) until budding and rooting. The budded and rooted cuttings were then transferred into pots containing 120 g of soil (1:1:1 v/v turf, perlite, sand) that had been autoclaved twice (121 °C, 15 min). To avoid reactions to potting stress, newly potted plants were maintained one week in a plant growth chamber (photoperiod 18/6, 45% humidity, 25 °C) before treatment.

Ozone dissolution in water

Ozone was produced with a LAB2B Ozone Generator (Ozonia, Dubendorf, Switzerland) supplied with pure oxygen. Ozone was dissolved in 10 mL of sterile water by bubbling it through a frit for 10 minutes. The gas-flow rate was fixed at 10 L/h. The ozone concentration in the inlet gas was 10, 20, or 60 g/m^3. The concentration of ozone dissolved in water was calculated by using Henry's law:

$$[O_3]_l^* = \frac{\rho_{H_2O}}{M_{H_2O}} \times \frac{R \times T}{He} \times [O_3]_g$$

where M_{H_2O} is the molecular weight of water in g/mol, R is the ideal gas constant (0.082 L atm mol^{-1} K^{-1}), T is the temperature in Kelvin, and He is the Henry constant in atm. The Henry constant (He) is obtained by using the Roth and Sullivan (Roth & Sullivan 1981) equation

$$He = 3.84 \times 10^7 \times [OH^-]^{0.035} \times \exp\left(\frac{-2428}{T}\right)$$

where ρ_{H_2O} is the density of water density in kg/m^3.

By using this approach, the three different concentrations of ozone dissolved in water were estimated to be about 2.2, 4.5, or 13.5 g/m^3 at 20 °C, pH 7, and 1 atm.

***In vitro* assay of ozonated water treatment on *Phaeoacremonium aleophilum* spores**

Effect of ozonated water treatment on P. aleophilum spore count and shape

To visualize spores within the first hour following ozonation treatment, 100 µL of a 10^4 spores per µL spore solution of *P. aleophilum* were added to six 1.5 mL tubes. Three tubes received 900 µL of ozonated water (13.5 g/m^3) and three tubes received autoclaved de-ionized water (121 °C; 15 min). Spores were quantified at 1 hour post treatment (hpt) by using a Malassez cell and observed under a Leica DM750 light microscope (Leica Microsystems GmbH, Germany). Photographs were recorded by using a CMEX-DC5000 camera and its software ImageFocus®v3 (Euromex, Netherlands).

Effect of ozonated water treatment on P. aleophilum spore germination

To treat spores with ozonated water, 6 µL of *P. aleophilum* spore solution (10^7 spores per mL) were transferred into 1.5 mL Eppendorf tubes. Each tube then received 1 mL of ozonated

water (2.2, 4.5, or 13.5 g/m^3 of ozone dissolved into water) or autoclaved de-ionized water (121 °C, 15 min) as a control. After 10 min, a volume of 840 µL was pipetted from the surface of each solution and discarded. Fifty µL were plated on a Petri dish with the PDA medium. Three such Petri dishes were prepared for each modality of ozonated water. The plates were then stored in the dark at 26 °C to compare the germination of spores treated with aqueous ozone with that of spores treated with sterile water.

In planta assay of ozonated water treatments

Effect of ozonated water treatment on P. aleophilum-grapevine interactions

As shown in Figure 1, three-eyed cuttings (*n* = 36) were pruned and inoculated with 1 × 10^5 spores of *P. aleophilum*. Immediately after inoculation, the injury received either 20 µL of ozonated water (4.5 g/m^3, *n* = 18) or 20 µL of sterile water (*n* = 18). The samples (*N*) consisted of three pooled plants that were harvested 4 (*N* = 6) and 9 (*N* = 6) weeks post inoculation. Samples were then fixed in liquid nitrogen and stored at −80 °C prior to DNA extraction.

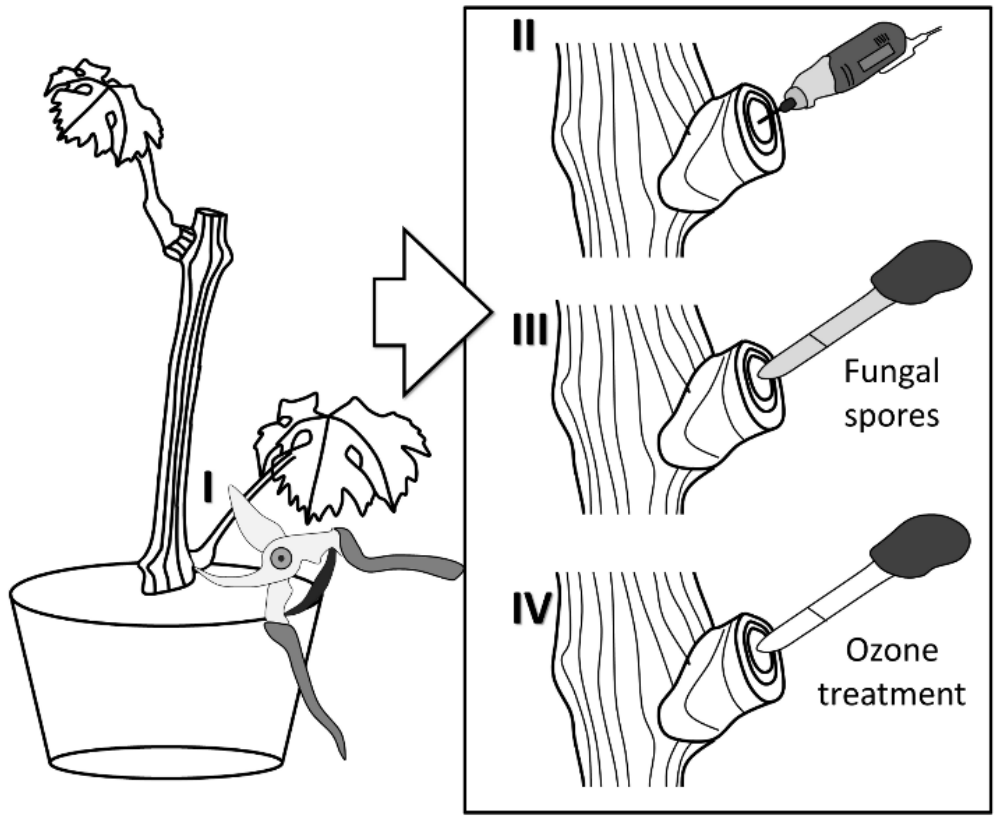


Figure 1. Pruning-wound model used to study esca disease in laboratory conditions. (I) Pruning lower branch of a grapevine cutting. (II) Drilling injury site deposit solutions of (III) spores of P. aleophilum, (IV) ozonated water or, for the control, sterile water.

DNA extraction was done as per Pouzoulet *et al*. (Pouzoulet et al. 2013). Briefly, the samples were lyophilized for 24 hours before being ground at room temperature. The powder was incubated for 1 hour at 65 °C in a DNA extraction buffer (CTAB 2%, PVPP 2%, Tris base 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M, pH = 8.0, 5 µL β-mercaptoethanol, 5 µL RNAse A). A half volume of a chloroform-isoamyl alcohol solution (24:1) was added, following which the mixture was incubated on ice. The mixture was then centrifuged and the supernatant was mixed with AP2 buffer from the DNeasy plant mini Kit (Qiagen, USA). The subsequent steps were performed by using buffers, materials, and the protocol supplied with the DNeasy plant mini Kit. The final elution volume was 50 µL, and the samples were stored at −20 °C.

The fungal DNA was quantified according to Pouzoulet *et al*. (Pouzoulet et al. 2013), who developed *P. aleophilum* specific primers (Table 1) targeting a genomic region of the β-tubulin, which is present in a single copy per genome.

Table 1. Primers used to quantify fungal DNA as per (Pouzoulet et al. 2013). F corresponds to a primer tagged with a fluorochrome, as required for quantification by the PlexorTM technology.*

Primers	Sequences
PalQ	R :CGTCATCCAAGATGCCGAATAAAG F*:CGGTGGGGTTTTTACGTCTACAG

The reactions were done in a final volume of 25 µL, and the reaction mixtures contained 12.5 µL of 2X Plexor™ Master Mix (Promega, USA). Experiments were conducted with an ABI 7500 Real-Time PCR cycler (Applied Biosystems, USA) and the ABI SDS software v.1.4 with the default configuration. The cycling program consisted of (i) denaturing at 95 °C for 5 min, (ii) 40 cycles of 5 s at 95 °C for denaturation, followed by 35 s at 65 °C for both annealing and extension, and (iii) an additional 40 min melting analysis spanning from 60 to 95 °C. Data acquisition was done with the Plexor™ Analysis Software version 1.5.6.2 (Promega, USA). Data from the qPCR analysis was not normally distributed, so the statistical analyses consisted of Kruskal–Wallis rank sum tests done with the software R (R Core Team 2013).

Impact of ozonated water on gene regulation in pruning wound of grapevine cuttings

We studied whether ozonated water could cause a defensive reaction in plants. Three-eyed cuttings (*n* = 30) were pruned (Figure 1, panels I and II) and treated with either ozonated water (4.5 g/m^3, *n* = 15) or sterile water (*n* = 15), as depicted in Figure 1, panel IV. To assess the

impact of ozonated water on gene regulation in healthy plants, these plants were not infected. The local injury was then harvested at 48 hpt by using a surfaced sterilized secateurs (70% ethanol flamed) and then immediately placed in liquid nitrogen and stored at −80 °C for RNA extraction. Wood sections were harvested as close as possible to the injury (0.5 cm deep, 1 cm diameter). One sample consisted of n = 5 pooled plants, so the gene induction study was conducted on N = 3 samples of ozone-treated plants and N = 3 samples made of control plants treated with water.

Samples for RNA extraction were ground in liquid nitrogen by using a Retsch MM300 mortar grinder (60 s, 25 oscillations per second, two cycles; Retsch, Germany) in a 35 mL stainless-steel grinding jar (Retsch, Germany) with 20 mm stainless-steel balls (Retsch, Germany). The subsequent protocol is adapted from Pouzoulet *et al.* (Pouzoulet et al. 2013) and Southerton *et al.* (Southerton 1998). The powder (100–200 mg) was incubated 10 min at 65 °C in a RNA-extraction buffer (CTAB 2%, PVPP 2%, Tris 300 mM, EDTA 25 mM, NaCl 2 M, pH = 8, 2% β-mercaptoethanol) and centrifuged (15 min, 10 000 rpm, 4 °C). The liquid phase was carefully transferred in a new 2 mL tube. One volume of a phenol-chloroform-isoamyl alcohol solution (25:24:1) was added and the samples were then kept on ice as much as possible between the different steps of this protocol. Next, the mixture was centrifuged (30 s, 10 000 rpm, 4 °C) and the supernatant was mixed with 1 volume of chloroform-isoamyl alcohol solution (24:1) and centrifuged. This cleaning step was repeated and the supernatant was transferred into a new tube with 0.5 volume of 8 M LiCl solution. The samples were then stored overnight at −80 °C. The next day the samples were centrifuged (30 min; 10 000 rpm, 4 °C) until a pellet appeared on the bottom of the tube. The pellet was dissolved in 250 µL of SSTE buffer (SDS 0.5%, NaCl 1 M, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH = 8), mixed with 2 volumes of absolute ethanol and then transferred into a Qiagen cleaning column supplied by the manufacturer (RNeasy plant mini Kit, Qiagen, USA). The subsequent steps were performed by using buffers, materials, and the protocol supplied with the RNeasy plant mini Kit. The final elution volume was 50 µL and the samples were stored at −80 °C.

Early plant response to stress was assessed by measuring mRNA expression of defense-related genes in tissue surrounding the injury. Complementary DNA had to be generated from RNA samples prior to analysis by reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Total RNA was then quantified by measuring the optical density with a Biophotometer Plus (Eppendorf AG, Germany). A DNase reaction (1 U/l.30 min at 37 °C, DNase I, RNase free kit, Fermentas, Canada) was used to ensure that no contaminating genomic DNA was present, and the result was checked by a PCR test that used the total RNA extract as a template and primers of the reference gene Elongation Factor 1 alpha (EF1α, Table 2). The PCR products were then loaded in Tris Acetate EDTA-agarose gel (1% agarose 40 mM Tris 20 mM acetic acid and 1 mM EDTA, pH = 8.0). DNA was visualized by ethidium-bromide post staining and illumination by ultraviolet light. The results of RT-PCR were amplified by using a Maxima First

strand cDNA synthesis kit for RT-qPCR (Fermentas, Canada), starting from 1 µg of total RNA. qPCR experiments were conducted with an ABI 7500 Real-Time PCR cycler (Applied Biosystems, USA) and the ABI SDS software v.1.4 with the default configuration. The cycling program was as follows: (i) denaturation at 50 °C for 2 min and then 95 °C for 10 min, (ii) 40 cycles of 15 s at 95 °C for denaturation, followed by 1 min at 60 °C for both annealing and extension, and (iii) an additional melting analysis of 40 min from 60 to 95 °C.

Table 2. *Primer sequences of Vitis vinifera L. defense-related genes used in this study.*

Gene	Primer sequences	Functions	References
EF1-α	F 5'GAACTGGGTGCTTGATAGGC3' R 5'AACCAAAATATCCGGAGTAAAAGA3'	Elongation Factor 1 alpha Housekeeping gene	(Terrier et al. 2005)
PAL	F 5'TGCTGACTGGTGAAAAGGTG3' R 5'CGTTCCAAGCACTGAGACAA3'	Phenylalanine ammonia-lyase, Marker gene of the salicylic acid pathway and plant response to biotrophs	(Aziz et al. 2003; Thomma et al. 2001)
SOD	F 5'GTGGACCTAATGCAGTGATTGGA3' R 5'TGCCAGTGGTAAGGCTAAGTTCA3'	Superoxide dismutase Marker gene of plant response to oxidative stress	(Spagnolo et al. 2012; Mittler et al. 2004)
GSTphi	F 5'GTGATTGCCATGCAGAAGAG3' R 5'TTTTTGGTAGAAACGCTTTATGTT3'	Glutathione-S-transferase phi Marker gene of plant response to oxidative stress	
Lox9	F 5'CCCTTCTTGGCATCTCCCTTA3' R 5'TGTTGTGTCCAGGGTCCATTC3'	Lipoxygenase 9, Marker gene of the jasmonic acid pathway and plant response to necrotrophs	(Perazzolli et al. 2010; Thomma et al. 2001; Mittler et al. 2004)
GST	F 5'CACAAAACTACCACCCACCAA3' R 5'TCCTCACTCTCTTCAATCACTT3'	Glutathione-S-transferase Marker gene of plant response to oxidative stress	
STS8	F 5'AAGACATGTGTTGAGTGAGTATGGTA3' R 5'CTCGATGGTCAAGCCTGGT3'	Stilbene synthase 8 Antifungal properties	(Dai et al. 2012)
PR10a	F 5'GTTTTGACTGACGGCGTTGA3' R 5'TGGTGTGGTACTTGCTGGTGTT3'	Pathogenesis Related protein 10a Antifungal properties	(Figueiredo et al. 2008)

Equation $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was used (Livak & Schmittgen 2001) to calculate the gene expression relative to the housekeeping gene EF1α. The selected genes were the key gene markers of the defense pathways phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*), lipoxygenase 9 (*LOX 9*), pathogenesis-related protein 10a and stilbene synthase 8 (*PR10a* and *STS8*), glutathione-S-transferase phi, glutathione-S-transferase, and superoxide dismutase (*GSTphi*, *GST* and *SOD*). All primer sequences used are indicated in Table 2 which also indicates the metabolic pathways these enzymes are belonging to. Gene induction was considered biologically significant if the induction factor relative to the reference gene was larger than 2x or smaller than 0.5x. In both cases there is a two-fold change in gene expression due to the treatment compared to the relative induction observed in non-treated plants.

Results

The aim of this study is to test the efficiency of ozonated water to protect grapevine pruning wounds against the esca-associated fungus *Phaeoacremonium aleophilum*. To achieve this goal, laboratory tests were done to measure the impact of ozonated water on *P. aleophilum* spores and on its host *Vitis vinifera* L.

In vitro fungicide properties of ozonated water

By using a Mallassez cell, we first counted the number of spores remaining in a solution treated with ozonated water for comparison against a control sample treated with sterile water. The initial concentration was around 10^3 spores per µL. In both ozone-treated and sterile water-treated solution, 10^3 spores per µL were found (Figure 2A). The number of spores in solution remained relatively constant at the initial number, independent of the treatment received (Kruskal–Wallis chi-squared = 5.7931, df = 2, p-value > 0.05). Under higher magnification, the spores looked the same (Figure 2B&2C). We next measured the germination of *P. aleophilum* spores treated in Petri dishes either with water or with ozonated water. Spores treated with water developed correctly (Figure 2D). Spores in solutions treated with the various concentrations of ozonated water showed no viable germination (Figure 2E-G).

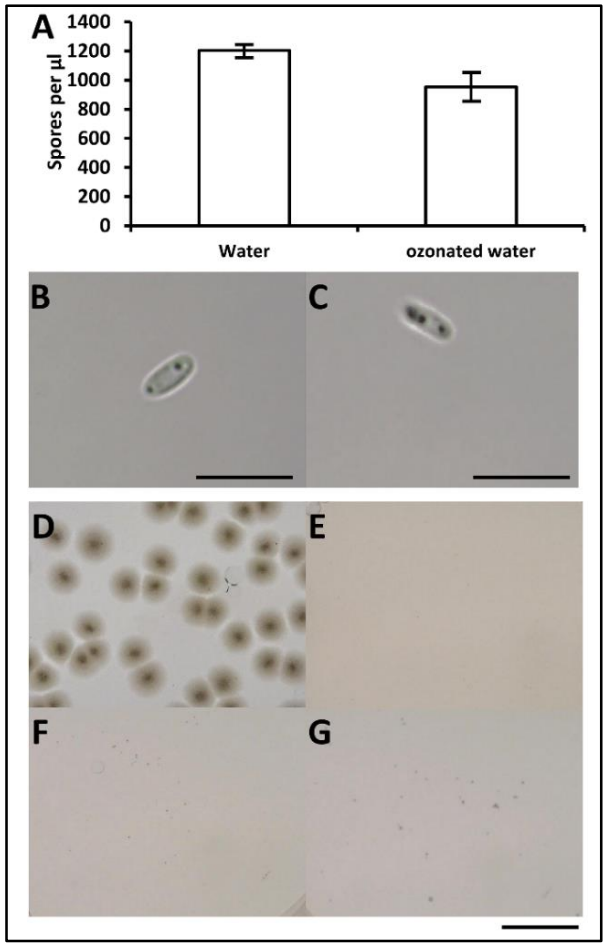


Figure 2. In vitro study of fungicide properties of ozonated water to control P. aleophilum. (A) Number of spores per µL spore solution treated with sterile or ozonated water (13.5 g/m3); photographs presenting similar spore integrity after sterile (B) or ozonated (C) water treatment (bars = 10 µm); photographs of young mycelia development of P. aleophilum spores treated with (D) sterile water, (E) 2.2 g/m3, (F) 4.5 g/m3, and (G) 13.5 g/m3 of ozonated water (bar = 1cm).

Pruning-wound perception to ozonated water

A set of genes was selected to study the impact of ozonated water on plant metabolism at 48 hpt, with the focus being on genes related to plant response to biotic and abiotic stress (4.5 g/m^3; see Figure 3). Genes encoding the antioxidant enzymes SOD, GSTphy, and GST were not regulated by our treatments at 48 hpt. Genes related to plant response to biotic stress and coding PAL, PR10a, and STS8 were also not regulated. Only the gene encoding the protein LOX9 was repressed both in ozone-treated plants and in water-treated plants at 48 hpt compared with undamaged control grapevine cuttings (Figure 3). This enzyme is involved early in plant response to wound damage and is a marker of the jasmonic acid pathway (Boubakri, Wahab, et al. 2013). Overall, this experiment reveals that, at 48 hpt, ozonated water has not served as a natural-defense stimulator for grapevine pruning wounds.

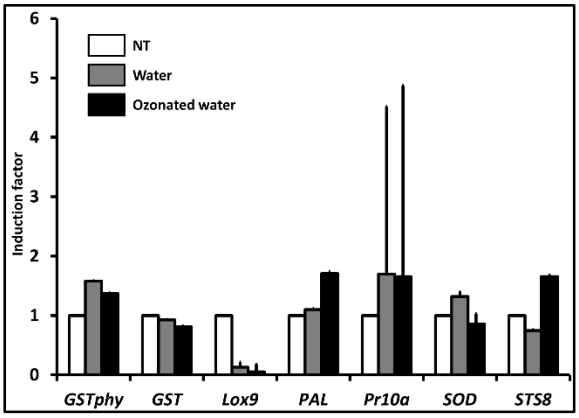


Figure 3. Relative induction factor of the defense-related genes glutathione S-transferase phy (GSTphy), glutathione S-transferase (GST), lipoxygenase 9 (LOX9) phenylalanine ammonia-lysase (PAL), Pr10a, superoxide dismutase (SOD), and stilbene synthase (STS8) at 48 h post inoculation by ozonated water (4.5 g/m3) or sterile water in a pruning wound. Induction factor is relative to the nontreated control plants (induction factor equal to unity) and the housekeeper gene EF1-α.

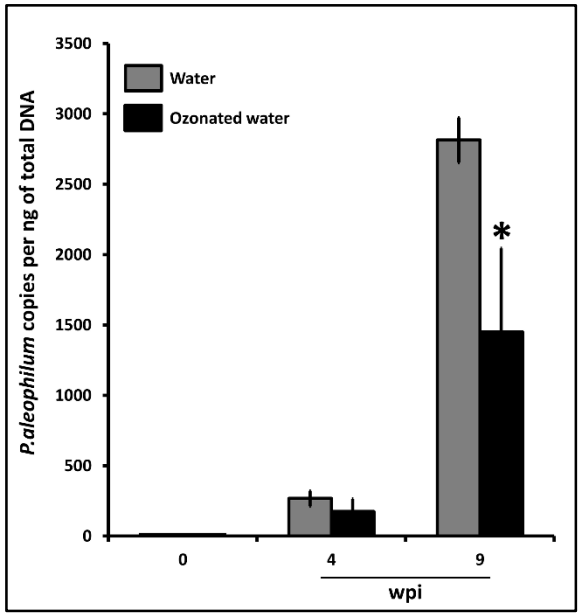


Figure 4. DNA quantification of Phaeoacremonium aleophilum 4 weeks (N = 6 samples of three pooled plants) and 9 weeks (N = 6 samples of three pooled plants) DNA quantification reflects fungal development according the two treatments: infected pruning wound receiving ozonated water (4.5 g/m^3) or control infected injuries receiving sterile water. T0 corresponds to DNA quantification in nontreated plant material. The asterisk (*) indicates a significant difference as determined by the Wilcoxon signed-rank test (p value < 0.05) and wpi means "weeks post inoculation."

Effect of ozone on fungal development *in planta*

The last step was to see if ozonated water applied to an inoculated pruning wound reduced the development of esca-associated fungal agents. Upon inoculating with ozonated water (4.5 g/m^3), no significant difference was observed between the treatment and the control treated with water at four weeks post inoculation (wpi). Within five weeks, the number of fungal DNA copies of *P. aleophilum* quadrupled in the trunk treated with ozonated water. At 9 wpi, the development of *P. aleophilum* in an inoculated pruning wound was significantly reduced (*N* = 6, Kruskal-Wallis chi-squared = 3.8571, df = 1, p-value < 0.05) in plants treated with ozonated water compared with infected injuries treated only with sterile water (Figure 4). No fungal DNA was detected in nontreated plants (see T = 0 Figure 4), which confirms that the material used for this study was free from *P. aleophilum*.

Discussion

The solution of ozone in water had a dramatic effect on the *Phaeoacremonium aleophilum* spores germination (Figures 2D–2G). *P. aleophilum* was affected by all ozone concentrations in water, which indicates that this fungal strain is highly sensitive to ozonated water. However, spores were still observable by microscope one hour after being treated with ozonated water (Figure 2A). Thus, the ozone did not directly cause the *P. aleophilum* spores to collapse (Figure 2B &2C) but probably affected the probability of successful spore germination in another way that, for the moment, remains unclear. Several hypotheses may be entertained to explain this result. First, spore inactivation can be explained by altered membrane integrity. In cell membranes, several families of molecules could be targeted by ozone, such as polyunsaturated fatty acids or chitin, cellulose, or hemi-celluloses, all of which are part of the cell wall of fungi (Soriano et al. 2003; Pryor et al. 1995). Ozone, ozonides, and free radicals directly affect spore germination and may induce apoptosis through cell-signaling cascades (Pryor et al. 1995).

In the literature, fungal spores are reported to be more resistant than bacteria (Alexopoulos et al. 2013; Restaino et al. 1995). *P. aleophilum* appears to be a suitable model fungus with which to investigate mechanisms responsible for the fungicide properties of ozonated water, which is a strong and promising *in vitro* fungicide.

Assuming the desired *in vitro* fungicidal effect of ozonated water is clear, a successful control tool should target the pathogen at the right moment in its infection cycle. For instance, 5 mM *in vitro* iron sulfate inhibits *P. aleophilum* growth by 40% and appears to be a promising control agent when applied to soil supplements because this compound is absorbed by the roots and redistributed throughout the plant via xylem translocation (Fleurat-Lessard et al. 2011). Protecting pruning wounds with ozonated water is first dedicated to grapevine nurseries. In fact, the original aim was to protect wound damage from spore inoculum present on pruning tools, in hydration tanks, or on grafting machines (Aroca et al. 2010). During these steps, plants are either becoming active or are already fully active. Thus, measuring pathogen development in inoculated tissues of young grapevine cuttings by using the tools of molecular biology appears to be an appropriate way to test the fungicidal properties of ozonated water. In this case, quantification reflects the number of initial inoculum that successfully invaded plant tissue via a mechanical wounding.

Although the *in vitro* effect of ozonated water on *P. aleophilum* is dramatic, the *in planta* effect is less drastic. At 9 wpi, a clear decrease of fungal material occurs in ozone-treated plants (nearly a factor-of-two decrease). Although ozonated water affects the colonization of a wound by *P. aleophilum* (Figure 4), it is important to note that the pathogen may still infect the grapevine's trunk. This result is from a laboratory experiment where 10^5 spores suspended

in 20 µL were injected into pruning wounds. The wounds then received sterile water or 20 µL of ozonated water, which is a particularly low concentration considering the significant quantity of organic compounds in the environment that may potentially react with ozone. In addition, this result at 9 wpi remains remarkable because of the very slow growth of *P. aleophilum* in the plant. In fact, β-tubulin DNA copies of *P. aleophium* between 4 and 9 wpi quadrupled, suggesting that around two replication cycles occurred within five weeks in inoculated plants treated with ozonated water.

The other potential in-field application of ozonated water may be for protecting pruning wounds. Inoculation in the trunk after removing a green branch is closer to green pruning than winter pruning. Thus, the effect of ozonated water on active tissue is questionable. A set of genes associated with defense in *Vitis vinifera* was selected to investigate whether ozonated water affects the regulation of pathways associated with plant response to abiotic and biotic stresses (Figure 3). Gene-induction studies of early events are difficult because of the background caused by the plant response to wounding damage within the first two days following treatment. Thus, 48 hpt was a good compromise for this study. Genes encoding the SOD, GST, and GSTphy enzymes are involved in plant response to oxidative stress (Sheehan et al. 2001; Alscher 2002). There is no regulation due to ozonated water or pruning-wound damage in these genes at 48 hpi. In addition, genes encoding PAL, PR10a, and STS8 are related to grapevine response to biotic stress (Chong et al. 2008; Dai et al. 2012; Boubakri, Poutaraud, et al. 2013) and, compared with undamaged plants, are not regulated by ozonated water or pruning-wound damage. Compared with nontreated plants, only the gene *Lox9* responded to both ozonated and sterile water treatments. The lipoxygenase enzyme is associated with the jasmonic acid pathway and to wounding response (Farmer & Ryan 1992). Thus, this gene could be down regulated at 48 hpt because, compared with the nontreated control plant, the plant would be recovering from the intense stress of wounding damage.

Plants treated with ozonated water remained as healthy as the control plants. This observation, together with the study of the expression of defense-associated genes in response to ozonated water suggests a small risk of toxicity due to treatment with ozonated water. The results from Fujiwara *et al.* (Fujiwara et al. 2011) show that repeated spraying of ozonated water does not cause visible symptoms on seedlings of tomato, melon, water melon, eggplant, or cucumber. More research is necessary before envisioning any large-scale application of ozonated water to grapevine culture. Nevertheless, it is encouraging that ozonated water did not yet cause any symptom and did not degrade the yield when applied in the irrigation system of hydroponic tomatoes (Graham et al. 2011). Consequently, spraying ozonated water in field conditions could be possible. The laboratory model tested in this study was not developed to reflect annual pruning wounds, which occur during the cold season on lignified dormant branches. Further tests are required at lower temperatures on dormant woody tissues to investigate this aspect of protecting pruning wounds with ozonated water.

To conclude, this study clarifies the potential of ozonated water to control the esca-associated fungus *Phaeoacremonium aleophilum*. The study consisted of three parts: the fungicide properties of ozonated water were observed *in vitro* and *in planta* and the impact of ozonated water on the plant itself was assessed. This study proposes the first laboratory model based on molecular biology to screen within months for biological or chemical agents for controling esca-associated fungi. Ozonated water appears to be a strong fungicide candidate for decreasing, but not eradicating, the inoculum of *P. aleophilum* spores that may infect wounds on cuttings and young grapevine plants in nurseries. Ozonated water should not be considered as a miracle cure for esca, but simply as one tool in the arsenal of tools needed to successfully control esca disease.

Acknowledgments

The authors are grateful to French ministry and the Midi-Pyrénées Region for funding by Grant No. 11050420 and to the European Cost action FA1303. We are also grateful to the Daydé nursery (Gaillac, France) for supplying the high-quality plant material for this study.

References

Agusti-Brisach, C. & Armengol, J., 2013. Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies. Phytopathologia Mediterranea, 52(2), pp 245-261.

Alexopoulos, A., Plessas, S., Ceciu, S., Lazar, V., Mantzourani, I., Voidarou, C., Stavropoulou, E. & Bezirtzoglou, E., 2013. Evaluation of ozone efficacy on the reduction of microbial population of fresh cut lettuce (*Lactuca sativa*) and green bell pepper (*Capsicum annuum*). Food Control, 30(2), pp 491-496.

Alscher, R.G., Erturk, N. & Heath, L.S., 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany, 53(372), pp 1331-1341.

Amr, M., 2012. Antioxidant Enzyme M. A. El-Missiry, ed., InTech.

Andolfi, A., Mugnai, L., Luque, J., Surico, G., Cimmino, A. & Evidente, A., 2011. Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. Toxins (Basel), 3(12), pp 1569-1605.

Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J.-C. & García-Río, L., 2008. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. Agriculture, Ecosystems & Environment, 123(4), pp 247-260.

Aroca, Á., Gramaje, D., Armengol, J., García-Jiménez, J. & Raposo, R., 2010. Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. European Journal of Plant Pathology, 126(2), pp 165-174.

Aroca, A. & Raposo, R., 2009. Pathogenicity of *Phaeoacremonium* Species on Grapevines. Journal of Phytopathology, 157(7-8), pp 413-419.

Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bézier, A., Lambert, B., Joubert, J.-M. & Pugin, A., 2003. Laminarin Elicits Defense Responses in Grapevine and Induces Protection Against *Botrytis cinerea* and

Plasmopara viticola. Molecular Plant-Microbe Interactions, 16(12), pp 1118-1128.

Belhadj, A., Telef, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S. & Mérillon, J.-M., 2008. Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. Plant Physiology and Biochemistry, 46(4), pp 493-499.

Bertsch, C., Ramírez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E., Spagnolo, A., Clément, C. & Fontaine, F., 2013. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. Plant Pathology, 62(2), pp 243-265.

Boubakri, H., Poutaraud, A., Wahab, M.A., Clayeux, C., Baltenweck-Guyot, R., Steyer, D., Marcic, C., Mliki, A. & Soustre-Gacougnolle, I., 2013a. Thiamine modulates metabolism of the phenylpropanoid pathway leading to enhanced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine. Bmc Plant Biology, 13(1), pp 31.

Boubakri, H., Wahab, M.A., Chong, J., Gertz, C., Gandoura, S., Mliki, A., Bertsch, C. & Soustre-Gacougnolle, I., 2013b. Methionine elicits H2O2 generation and defense gene expression in grapevine and reduces Plasmopara viticola infection. Journal of Plant Physiology, 170(18), pp 1561-1568.

Bruez, E., Grizard, D., Vallance, J., Massot, M., Grizard, D., Regnault-Roger, C. & Rey, P., 2011. Characterization of endophytic microflora colonizing wood tissues of healthy and Esca-diseased vines. Phytopathology, 101(6), pp S21–S21.

Bruez, E., Vallance, J., Gerbore, J., Lecomte, P., Da Costa, J.P., Guerin-Dubrana, L. & Rey, P., 2014. Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of esca leaf-symptomatic and asymptomatic vines. Plos One, 9(5), pp e95928.

Chong, J., Le Henanff, G., Bertsch, C. & Walter, B., 2008. Identification, expression analysis and characterization of defense and signaling genes in *Vitis vinifera*. Plant Physiology and Biochemistry, 46(4), pp 469-481.

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(4), pp 435-455.

Dai, R., Ge, H., Howard, S. & Qiu, W., 2012. Transcriptional expression of Stilbene synthase genes are regulated developmentally and differentially in response to powdery mildew in Norton and Cabernet Sauvignon grapevine. Plant Science, 197(1), pp 70-76.

Eskalen, A., Feliciano, A.J. & Gubler, W.D., 2007. Susceptibility of Grapevine Pruning Wounds and Symptom Development in Response to Infection by *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora*. Plant Disease, 91(9), pp 1100-1104.

Farmer, E.E. & Ryan, C.A., 1992. Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase Inhibitors. Plant Cell, 4(2), pp 129-134.

Figueiredo, A., Fortes, A.M., Ferreira, S., Sebastiana, M., Choi, Y.H., Sousa, L., Acioli-Santos, B., Pessoa, F., Verpoorte, R. & Pais, M.S., 2008. Transcriptional and metabolic profiling of grape (*Vitis vinifera* L.) leaves unravel possible innate resistance against pathogenic fungi. Journal of Experimental Botany, 59(12), pp 3371-3381.

Fischer, M., 2006. Grapevine Wood Decay and Lignicolous Basidiomycetes. Phytopathologia Mediterranea, 39(1), pp 100-106.

Fleurat-Lessard, P., Dédaldéchamp, F., Thibault, F., Béré, E. & Roblin, G., 2011. Antifungal effects of iron sulfate on grapevine fungal pathogens. Scientia Horticulturae, 130(3), pp 517-523.

Fourie, P.H. & Halleen, F., 2004. Proactive Control of Petri Disease of Grapevine Through Treatment of Propagation Material. Plant Disease, 88(11), pp 1241-1245.

Fujiwara, K., Fujii, T. & Park, J.-S., 2009. Comparison of Foliar Spray Efficacy of Electrolytically Ozonated Water and Acidic Electrolyzed Oxidizing Water for Controlling Powdery Mildew Infection on Cucumber Leaves. Ozone: Science & Engineering, 31(1), pp 10-14.

Fujiwara, K., Hayashi, Y. & Park, J.-S., 2011. Spraying Ozonated Water under Well-Ventilated Conditions Does Not Cause Any Visible Injury to Fruit-Vegetable Seedlings. Ozone: Science & Engineering, 33(2), pp 179-182.

Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D. & Pugin, A., 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. Molecular plant-microbe interactions : MPMI, 19(7), pp 711-724.

Graham, T., Zhang, P., Woyzbun, E. & Dixon, M., 2011. Response of hydroponic tomato to daily applications of aqueous ozone via drip irrigation. Scientia Horticulturae, 129(3), pp 464-471.

Gramaje, D. & Armengol, J., 2011. Fungal Trunk Pathogens in the Grapevine Propagation Process: Potential Inoculum Sources, Detection, Identification, and Management Strategies. Plant Disease, 95(9), pp 1040-1055.

Grosman, J. & Doublet, B., 2012. Maladies du bois de la vigne: Synthèse des dispositifs d'observation au vignoble, de l'observatoire 2003-2008 au réseau d'épidémiosurveillance actuel. Phytoma-La Défense des végétaux, 651, pp 31–35.

Guzel-Seydim, Z.B., Greene, A.K. & Seydim, A.C., 2004. Use of ozone in the food industry. LWT - Food Science and Technology, 37(4), pp 453-460.

Halleen, F., Crous, R.W. & Petrin, O., 2003. Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. Australasian Plant Pathology, 32(1), pp 47-52.

Halleen, F., Fourie, P.H. & Crous, P.W., 2007. Control of black foot disease in grapevine nurseries. Plant Pathology, 56(4), pp 637-645.

Khadre, M.A., Yousef, A.E. & Kim, J.G., 2001. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. Journal of Food Science, 66(9), pp 1242-1252.

Lecomte, P., Darrieutort, G., Liminana, J.M., Comont, G., Muruamendiaraz, A., Legorburu, F.J., Choueiri, E., Jreijiri, F., El Amil, R. & Fermaud, M., 2012. New Insights into Esca of Grapevine: The Development of Foliar Symptoms and Their Association with Xylem Discoloration. Plant Disease, 96(7), pp 924-934.

Leroux, P., 2003. Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. Comptes Rendus Biologies, 326(1), pp 9-21.

Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, 25(4), pp 402-408.

Miller, F., Silva, C.M. & Brandão, T.S., 2013. A Review on Ozone-Based Treatments for Fruit and Vegetables Preservation. Food Engineering Reviews, 5(2), pp 77-106.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. & Van Breusegem, F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. Trends in Plant Science, 9(10), pp 490-498.

Mostert, L., Groenewald, J.Z., Summerbell, R.C., Robert, V., Sutton, D.A., Padhye, A.A. & Crous, P.W., 2005. Species of Phaeoacremonium associated with infections in humans and environmental reservoirs in infected woody plants. Journal of Clinical Microbiology, 43(4), pp 1752-1767.

Mugnai, L., Graniti, A. & Surico, G., 1999. Esca (Black measles) and brown wood-streaking: Two old and elusive diseases of grapevines. Plant Disease, 83(5), pp 404–418.

Ohashi-Kaneko, K., Yoshii, M., Isobe, T., Park, J.-S., Kurata, K. & Fujiwara, K., 2009. Nutrient Solution Prepared with Ozonated Water does not Damage Early Growth of Hydroponically Grown Tomatoes. Ozone: Science & Engineering, 31(1), pp 21-27.

Park, J.-S., Ishii, M., Okushima, L., Sase, S. & Fujiwara, K., 2008. Effects of Ozonated Water-fog Cooling on Ozone Gas Concentrations and Population Densities of Airborne Bacteria and Fungi on Plant Leaves in a Naturally Ventilated Greenhouse. JARQ, 42(4), pp 291–298.

Park, J.-S., Isobe, T., Kusakari, S. & Fujiwara, K., 2009. Promotion of Adventitious Roots in Chrysanthemum Cuttings by Soaking in Ozonated Water. Ozone: Science & Engineering, 31(1), pp 15-20.

Perazzolli, M., Bampi, F., Faccin, S., Moser, M., De Luca, F., Ciccotti, A.M., Velasco, R., Gessler, C., Pertot, I. & Moser, C., 2010. *Armillaria mellea* induces a set of defense genes in grapevine roots and one of them codifies a protein with antifungal activity. Molecular plant-microbe interactions : MPMI, 23(4), pp 485-496.

Pezet, R., Gindro, K., Viret, O. & Spring, J.L., 2004. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. Physiological and Molecular Plant Pathology, 65(6), pp 297-303.

Pouzoulet, J., Mailhac, N., Couderc, C., Besson, X., Dayde, J., Lummerzheim, M. & Jacques, A., 2013. A method to detect and quantify *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* DNA in grapevine-wood samples. Applied Microbiology and Biotechnology, 97(23), pp 10163-10175.

Pryor, W.A., Squadrito, G.L. & Friedman, M., 1995. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. Free Radical Biology and Medicine, 19(6), pp 935-941.

R Core Team, 2013. R: A Language and Environment for Statistical Computing.

Rabea, E.I., Badawy, M.E.T., Stevens, C.V., Smagghe, G. & Steurbaut, W., 2003. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. Biomacromolecules, 4(6), pp 1457-1465.

Rego, C., Nascimento, T., Cabral, A., Silva, M.J. & Oliveira, H., 2009. Control of grapevine wood fungi in commercial nurseries. Phytopathologia Mediterranea, 48(1), pp 128-135.

Restaino, L., Frampton, E.W., Hemphill, J.B. & Palnikar, P., 1995. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. Applied and Environmental Microbiology, 61(9), pp 3471-3475.

Rooney-Latham, S., Eskalen, A. & Gubler, W.D., 2005a. Occurrence of *Togninia minima* Perithecia in Esca-Affected Vineyards in California. Plant Disease, 89(8), pp 867-871.

Rooney-Latham, S., Eskalen, A. & Gubler, W.D., 2005b. Ascospore Release of *Togninia minima*, Cause of Esca and Grapevine Decline in California. Plant Health Progress, doi:10.1094/PHP-2005-0209-01-RS.

Roth, J.A. & Sullivan, D.E., 1981. Solubility of ozone in water. Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals, 20(2), pp 137-140.

Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M. & Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochemical Journal, 360(Pt 1), pp 1-16.

Smilanick, J.L., Margosan, D.M. & Mlikota Gabler, F., 2002. Impact of Ozonated Water on the Quality and Shelf-life of Fresh Citrus Fruit, Stone Fruit, and Table Grapes. Ozone: Science & Engineering, 24(5), pp 343-356.

Soriano, N.U., Jr., Migo, V.P. & Matsumura, M., 2003. Functional group analysis during ozonation of sunflower oil methyl esters by FT-IR and NMR. Chemistry and Physics of Lipids, 126(2), pp 133-140.

Southerton, S.G., Marshall, H., Mouradov, A. & Teasdale, R.D., 1998. Eucalypt MADS-box genes expressed in developing flowers. Plant Physiology, 118(2), pp 365-372.

Spagnolo, A., Magnin-Robert, M., Alayi, T.D., Cilindre, C., Mercier, L., Schaeffer-Reiss, C., Van Dorsselaer, A., Clement, C. & Fontaine, F., 2012. Physiological changes in green stems of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay in response to esca proper and apoplexy revealed by proteomic and transcriptomic analyses. Journal of Proteome Research, 11(1), pp 461-475.

Staehelin, J. & Hoigne, J., 1982. Decomposition of ozone in water: rate of initiation by hydroxide ions and hydrogen peroxide. Environmental Science & Technology, 16(10), pp 676-681.

Terrier, N., Glissant, D., Grimplet, J., Barrieu, F., Abbal, P., Couture, C., Ageorges, A., Atanassova, R., Leon, C., Renaudin, J.P., Dedaldechamp, F., Romieu, C., Delrot, S. & Hamdi, S., 2005. Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. Planta, 222(5), pp 832-847.

Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R. & Polasky, S., 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. Nature, 418(6898), pp 671-677.

Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Vernet, G. & Aziz, A., 2006. Chitosan Stimulates Defense Reactions in Grapevine Leaves and Inhibits Development of Botrytis Cinerea. European Journal of Plant Pathology, 114(4), pp 405-413.

Wedemeyer, G.A., Nelson, N.C. & Smith, C.A., 1978. Survival of the Salmonid Viruses Infectious Hematopoietic Necrosis (IHNV) and Infectious Pancreatic Necrosis (IPNV) in Ozonated, Chlorinated, and Untreated Waters. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 35(6), pp 875-879.

Young, S.B. & Setlow, P., 2004. Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore resistance to and killing by aqueous ozone. Journal of Applied Microbiology, 96(5), pp 1133-1142.

Zanzotto, A., Gardiman, M. & Lovat, L., 2008. Effect of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* sp. on in vitro grapevine plants. Scientia Horticulturae, 116(4), pp 404-408.

Cette étude montre clairement que l'eau ozonée est un candidat pour limiter l'infection des plaies de taille par le champignon associé à l'esca *P. aleophilum*. L'effet fongicide *in vitro* est remarquable. *In planta,* l'effet est moins drastique. L'inoculum susceptible d'infecter la plaie est seulement réduit, et non pas éradiqué, 9 semaines après traitement. Néanmoins cet effet est intéressant puisqu'il n'y a toujours pas de solutions efficaces pour lutter contre l'esca. Des expériences supplémentaires pourraient optimiser l'utilisation de l'eau ozonée durant le processus de fabrication des plants greffés-soudés dans les pépinières viticoles.

Chapitre V : Conclusion générale et perspectives

L'esca est un pathosystème complexe (Bertsch et al. 2013) dont l'expression des symptômes de la maladie dépendent de facteurs environnementaux mal compris (Guérin-Dubrana et al. 2013). De plus les symptômes foliaires sont difficilement corrélés à la présence d'un pathogène en particulier dans le bois (Bertsch et al. 2013; Bruez et al. 2012; Lecomte et al. 2012). Cependant lorsque ces pathogènes sont inoculés artificiellement dans le bois, ils causent des décolorations et des nécroses dans ces tissus (Laveau et al. 2009; Pouzoulet et al. 2013; Urbez-Torres & Gubler 2011). Nous nous sommes donc attachés à étudier les mécanismes impliqués dans les interactions entre la vigne et deux champignons associés à l'esca dans le bois.

Les travaux engagés durant cette thèse répondent à deux objectifs : la compréhension des mécanismes précoces impliqués dans les interactions vigne-champignons, et la proposition de moyens de lutte contre l'esca pour une viticulture durable.

1 LA COMPREHENSION DES EVENEMENTS PRECOCES DES INTERACTIONS ENTRE LE BOIS DE LA VIGNE ET LES CHAMPIGNONS ASSOCIES A L'ESCA

La colonisation du bois de la vigne au niveau d'une blessure a été observée dans les premières semaines suivant l'inoculation de *P. aleophilum* et *P. chlamydospora*. Des souches exprimant le gène codant la protéine GFP ont été développées afin de marquer spécifiquement ces champignons lors de leur développement dans les tissus ligneux. Deux types de tissus ont été étudiés : l'inoculation en modèle plaie de taille et l'inoculation en modèle entre-nœud. La colonisation du modèle plaie de taille semble plus difficile pour les deux espèces de champignons étudiées. Il y aurait donc des différences physiologiques entre ces deux tissus. L'étude d'expression des gènes de défense a également montré que les gènes sélectionnés ont répondu différemment suivant le tissu inoculé.

Les fibres du xylème seraient le tissu colonisé en priorité par *P. aleophilum*, avant de coloniser les vaisseaux du xylème, le parenchyme et la moelle du bois. Il a été montré que *P. aleophilum* dégrade les parois de ces fibres (Fleurat-Lessard et al. 2014). Celles-ci auraient donc une importance particulière dans la colonisation de cette espèce. Le développement de moyens de lutte, limitant la colonisation précoce, pourra notamment cibler l'induction de défense dans ce tissu, ou bien veiller à ce que l'agent de biocontrôle colonise les fibres du xylème. La

colonisation de *P. chlamydospora* 12 semaines après traitement était similaire lors de la co-inoculation des deux pathogènes. Étendre l'étude de la colonisation des organismes associés aux maladies du bois à plusieurs espèces permettrait de s'approcher progressivement du cocktail associé à l'esca. Pour cela deux approches techniques sont envisageables. En laboratoire la technique de transformation utilisée dans ce travail permettrait de marquer avec le gène *gfp* les champignons. Réaliser différentes cassettes contenant des gènes marqueurs fluorescents dans différentes couleurs, insérées dans *Agrobacterium tumefaciens,* faciliterait la localisation de plusieurs espèces co-inoculées dans la même blessure. Ainsi les interactions microbe-microbe *in planta* seraient suivies à différent points de cinétiques. De manière générale, étendre la cinétique pour observer la progression des pathogènes dans la bouture renseignerait de l'agressivité des différentes espèces. Cependant le modèle développé dans cette thèse permet de réaliser des expériences jusqu'à environ 12 semaines. Ensuite le modèle de boutures en tentes de cultures n'est plus adapté.

L'autre approche serait le développement de la microscopie FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization) sur champignon dans le bois de la vigne. La première étape de la FISH consiste à créer, lorsqu'elle n'est pas déjà disponible, une sonde ADN, spécifique à une séquence de l'ARNr de l'espèce d'intérêt. Cette sonde est marquée avec un fluorochrome. En maitrisant les conditions d'hybridation, il est possible d'hybrider spécifiquement cette amorce sur son ARNr cible. Etant donné que les ribosomes sont répartis quasiment dans tout le cytoplasme, la sonde révèle tout l'organisme. Nous avons tenté de mettre au point cette technique durant cette thèse, mais sans succès. Pourtant la FISH sur bactéries dans le bois de la vigne est développée (Compant et al. 2008; Campisano et al. 2014), cependant les champignons semblent être des organismes plus difficiles à marquer du fait de leur épaisse paroi cellulaire. Cette technique serait l'occasion de localiser les différents pathogènes dans le bois à partir d'échantillons prélevés au vignoble.

L'étude en microscopie de la colonisation de *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* a également confirmé que le bois la vigne répond à l'inoculation. Des zones de réponses intenses ont été observées. La réponse du bois à *P. aleophilum* en microscopie semblerait spécifique à 6 semaines, mais similaire à la blessure 12 semaines après traitement. Les vaisseaux du xylème ont développé des tyloses gênant la colonisation des champignons.

L'approche moléculaire a confirmé une partie des observations en microscopie. Le groupe de gène sélectionné pour cette étude a répondu différemment aux traitements suivant le type de tissu. La réponse à la blessure est importante. Celle-ci masque souvent la perception des champignons, surtout en modèle plaie de taille. Il est donc important d'étudier la réponse de la blessure en plus de la réponse aux pathogènes inoculés dans le bois dans notre modèle. Cette étude a mis en évidence que le bois de la vigne pourrait percevoir l'identité des micro-organismes présents dans la blessure. C'est la première fois que la spécificité de la réponse du bois de la vigne est suggérée dans le contexte des interactions plante-microorganismes. La spécificité de la perception du bois n'est que suggérée compte tenu du nombre limité de gènes étudié, et du peu de gènes ayant répondu différemment à *P. aleophilum*, *P. chlamydospora* et la blessure seule dans un même point de cinétique. Cette étude préliminaire était indispensable avant d'envisager une approche plus globale, en RNAseq par exemple. En effet, l'effet recherché est ténu, et il aurait été très audacieux d'investir dans la technologie RNAseq compte tenu du peu de recul que possède notre laboratoire sur ce modèle.

L'analyse de la réponse du génome de la vigne aux pathogènes associés aux maladies du bois permettrait de confirmer l'hypothèse de la spécificité des défenses induites dans le bois de la vigne. Elle renseignerait également des différentes voies de défense impliquées dans la réponse à ces champignons, autant d'indices supplémentaires afin de connaitre si la vigne les perçoit comme des biotrophe ou des nécrotrophe, et si l'orchestration de cette réponse est semblable au modèle *Arabidopsis*. Les points de cinétiques intéressants sont 48h et 120h après traitements d'après cette étude. Des points plus tardifs pourraient être envisagés, mais après cinq jours, au niveau local de la blessure, ce n'est plus la perception qui sera étudiée mais la mise en place des défenses dans le bois. Les résultats RNAseq des gènes impliqués dans la réponse précoce favoriserait la sélection des gènes clefs. C'est la fonction et l'activité de leurs protéines qu'il serait intéressant d'investiguer à des points de cinétiques plus longs. Afin de confirmer que les gènes exprimés lors de la réponse de la plante sont bien impliqués dans la défense de celle-ci, il conviendra de tester l'impact de cette réponse sur le développement des pathogènes.

Les deux modèles testés dans cette étude montrent des différences en termes de colonisation des champignons et de réponses histologique et moléculaire des tissus. Le développement du modèle plaie de taille avait été préféré à l'initiation de ce projet. En effet l'étude d'induction

de gène de défense semblait moins difficile sur un tissu plus actif. Finalement la comparaison des deux modèles indique que les variations des facteurs d'inductions mesurés en modèle plaie de taille sont trop importantes par rapport aux inductions en modèle entre-nœud. C'est donc le modèle entre-nœud qui est le plus recommandable pour les cinétiques d'induction de gène.

Le modèle plaie de taille n'est pas à rejeter pour autant. Les champignons se développent correctement dans ce tissu, et les éliciteurs présentés dans le chapitre de livre ont fortement induit les défenses du bois dans ce modèle quelques jours après inoculation. Le développement de l'eau ozonée pour protéger les plaies de taille a également été permis grâce à ce modèle.

La compréhension de la réponse du bois sert au développement d'outils de biocontrôle. En effet mieux comprendre le type de réponse permettrait de développer des éliciteurs ou des agents de biocontrôle capables de potentialiser ou d'induire les voies mises en place par la plante afin de limiter la colonisation des champignons associés à l'esca. La lutte contre l'esca nécessite une complémentarité des approches histologiques et moléculaire afin de mieux comprendre ce pathosystème.

2 LE DEVELOPPEMENT DE MOYENS DE LUTTE

Afin de tenir ces objectifs, il a été nécessaire de développer un modèle d'étude des maladies du bois en laboratoire. Une adaptation de ce modèle pour réaliser le criblage de moyens de lutte a été proposée. Il est possible de tester l'efficacité d'éliciteurs ou d'agents de contrôle biologique pour contrôler les pathogènes associés à l'esca sur une période de temps courte, entre deux et trois mois. Ce modèle permet d'opérer une sélection supplémentaire après le criblage sur boite des souches d'intérêt, avant de tester leurs efficacités au vignoble. Ce modèle permet également d'inoculer le produit à tester ou bien le pathogène dans différents tissus de la plante (système racinaire, bouture, modèle entre-nœud ou modèle plaie de taille). La méthode d'analyse d'expression de gènes permet de mesurer si les produits sont des stimulateurs de défenses naturelles de la vigne. L'avantage de réaliser un criblage avec ce modèle est de pouvoir déterminer en quelques mois le potentiel d'efficacité d'un traitement sur le développement des champignons dans le bois. Une étude de ce type au vignoble

nécessiterait plusieurs années. Cependant ce modèle ne permet pas d'étudier la diminution de l'apparition ou de l'intensité des symptômes foliaires d'esca. Il parait donc plus adapté au développement de molécules ou d'agents de biocontrôle limitant la colonisation précoce des jeunes plants.

L'utilisation de ce modèle est illustrée par le développement de l'eau ozonée afin de protéger les plaies de tailles de la vigne du champignon *P. aleophilum*. L'emploi de l'eau ozonée est répandu dans l'industrie agroalimentaire afin de lutter contre les maladies post-récolte. L'intérêt d'utiliser l'eau ozonée en agriculture vient de sa très faible rémanence dans l'environnement (Roth and Sullivan 1981). En effet la durée de demi-vie de l'ozone est d'une demi-heure environ, ensuite l'ozone dissous se décompose en oxygène. D'autre par l'eau ozonée est un oxydant puissant qui affecterait l'intégrité des membranes et pourrait induire la mort programmée dans les cellules des micro-organismes (Guzel-Seydim et al. 2004). L'effet fongicide *in vitro* de l'eau ozonée sur *P. aleophilum* est impressionnant. Aucune spore traitée n'a été capable de se développer sur boite. Pourtant les conidies ayant subi un traitement à l'eau ozonée sont toujours observables au microscope. L'effet de l'ozone sur les conidies de *P. aleophilum* n'est pas visible en microscopie optique. L'effet de l'eau ozonée a ensuite été testé *in planta* en modèle plaie de taille. Une plaie a été infectée avec des conidies de *P. aleophilum* et traitée avec de l'eau ozonée. L'effet est moins impressionnant *in planta* que sur boite. Néanmoins, deux fois moins d'ADN de *P. aleophilum* a été quantifié dans les plantes traitées à l'ozone par rapport au plantes infectées ayant reçu de l'eau. L'eau ozonée a donc protégé la plaie, et ce malgrès la faible quantité d'eau ozonée employée dans les conditions de l'expérience. La dose appliquée pourra être optimisée afin de trouver une fenêtre d'application optimale de l'eau ozonée. L'optimisation de ce protocole permetra ensuite de tester l'effet fongicide de ce produit sur différentes souches de champignons associées à l'esca, inoculées dans d'autres tissus. L'inoculation en modèle entre-nœud devra être étudiée car c'est le tissu qui s'avère le plus colonisé six semaines après inoculation de *P. aleophilum*.

Suite à la mise en évidence de l'effet de l'eau ozonée en condition de laboratoire, il faut envisager son utilisation sur le terrain. Ce transfert nécessite tout d'abord de tester son effet sur d'autres souches de *P. aleophilum* puis d'étendre cette étude aux autres espèces associées aux maladies du bois. Ensuite l'optimisation de l'application de l'eau ozonée nécessite de comprendre ses mécanismes d'action. Les deux pistes à suivre sont la perméabilisation de la

paroi des champignons et la dégradation des acides nucléiques (Pryor et al. 1995). L'eau ozonée n'aurait pas d'impact négatif sur la physiologie de la plante (Fujiwara et al. 2011). L'étude de l'expression des gènes de défense n'a pas révélé d'inductions dues à l'ozone. L'ozone agirait donc de manière directe sur les conidies en empêchant leur germination. Toutefois il ne faut pas exclure l'hypothèse d'une potentialisation des défenses (priming) de l'eau ozonée chez la vigne. Ce travail confirmant l'existance des mécanismes de défense induite dans le bois, une étude du phénomène de priming est envisageable dans ce tissu.

Le développement de ce moyen de lutte devra également définir quelles sont les étapes de la filière viticole à cibler pour une action optimale de l'eau ozonée. Les pépinières viticoles ont une position stratégique clef dans le lutte contre les maladies du bois puisqu'elles centralisent la production des plants greffés-soudés. D'autre part les étapes de réhydratation de sarments, ou les machines à greffer, sont des opérations où l'application de l'eau ozonée est envisageable.

L'étude des interactions précoces vigne-microorganismes pionniers de l'esca révèlent que la colonisation de *P. aleophilum* et *P. chlamydospora* est différente. D'autre part les différents tissus du bois ne répondent pas de la même manière. L'induction de gènes associés à la défense dans les quelques heures suivant l'inoculation suggère que le bois de la vigne régule ses voies de défense en fonction de l'identité du pathogène présent dans la plaie. Cette étude laisse donc entrevoir la possibilité de moduler les défenses du bois afin de limiter la colonisation précoce de celui-ci. Dans le même temps, ce modèle d'étude a permis le développement de l'eau ozonée afin de limiter la colonisation précoce des boutures. Cependant, d'autres voies de contaminations existent et doivent être étudiées, car la solution à cette maladie complexe qu'est l'esca viendra de l'intégration des différents moyens de lutte en développement.

Références

Les références utilisées dans les articles de cette thèse, que ce soit des revues ou des articles de recherche, et qui ont été préalablement développées, ne sont pas reprises dans cette bibliographie.

Afoufa-Bastien, D., Medici, A., Jeauffre, J., Coutos-Thévenot, P., Lemoine, R., Atanassova, R., and Laloi, M. 2010. The Vitis vinifera sugar transporter gene family: phylogenetic overview and macroarray expression profiling. BMC Plant Biol. 10:245

Agrios, G. 2005. *Plant Pathology*. 5th editio. E.A. Press, ed.

Alfonzo, A., Conigliaro, G., Torta, L., Burruano, S., and Moschetti, G. 2009. Antagonism of Bacillus subtilis strain AG1 against vine wood fungal pathogens. Phytopathol. Mediterr. 48:155–158

Alscher, R. G. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. J. Exp. Bot. 53:1331–1341

Andolfi, A., Mugnai, L., Luque, J., Surico, G., Cimmino, A., and Evidente, A. 2011. Phytotoxins Produced by Fungi Associated with Grapevine Trunk Diseases. Toxins (Basel). 3:1569–1605

Angelini, E., Clair, D., Borgo, M., Bertaccini, A., and Boudon-Padieu, E. 2001. Flavescence dorée in France and Italy-Occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. Vitis. 40:79–86

Antonielli, L., Compant, S., Strauss, J., Sessitsch, A., and Berger, H. 2014. Draft Genome Sequence of Phaeomoniella chlamydospora Strain RR-HG1, a Grapevine Trunk Disease (Esca)-Related Member of the Ascomycota. Genome Announc. 2:e00098–14

Arnold, C., Schnitzler, A., Douard, A., Peter, R., and Gillet, F. 2005. Is there a future for wild grapevine (Vitis vinifera subsp. silvestris) in the Rhine Valley? Biodivers. Conserv. 14:1507–1523

Aroca, A., and Raposo, R. 2007. PCR-based strategy to detect and identify species of Phaeoacremonium causing grapevine diseases. Appl. Environ. Microbiol. 73:2911–8

Aroca, A., Raposo, R., and Lunello, P. 2008. A biomarker for the identification of four Phaeoacremonium species using the beta-tubulin gene as the target sequence. Appl. Microbiol. Biotechnol. 80:1131–40

Aubertot, J. N., Barbier, J. M., Carpentier, A., Gril, J. J., Guichard, L., Lucas, P., Savary, S., Savini, I., and Voltz, M. 2005. *Pesticides, agriculture et environnement: réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux*. I. et C. Rapport d'Expertise scientifique collective, ed.

Aziz, A., Gauthier, A., Bézier, A., Poinssot, B., Joubert, J.-M., Pugin, A., Heyraud, A., and Baillieul, F. 2007. Elicitor and resistance-inducing activities of beta-1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with beta-1,3 glucans and alpha-1,4 oligogalacturonides. J. Exp. Bot. 58:1463–72

Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bézier, A., Lambert, B., Joubert, J.-M., and Pugin, A. 2003. Laminarin Elicits Defense Responses in Grapevine and Induces Protection Against Botrytis cinerea and Plasmopara viticola. Mol. Plant-Microbe Interact. 16:1118–1128

Azizur Rahman, M., Hasegawa, H., and Peter Lim, R. 2012. Bioaccumulation, biotransformation and trophic transfer of arsenic in the aquatic food chain. Environ. Res. 116:118–135

Banani, H., Roatti, B., Ezzahi, B., Giovannini, O., Gessler, G., Pertot, I., and Perazzolli, M. 2014. Characterization of resistance mechanisms activated by Trichoderma harzianum T39 and benzothiadiazole to downy mildew in different grapevine cultivars. Plant Pathol. 63:334–343

Basha, S. M., Mazhar, H., and Vasanthaiah, H. K. N. 2010. Proteomics Approach to Identify Unique Xylem Sap Proteins in Pierce's Disease-Tolerant Vitis Species. Appl. Biochem. Biotechnol. 160:932–944

Belhadj, A., Saigne, C., Telef, N., Cluzet, S., Bouscaut, J., Corio-Costet, M.-F., and Merillon, J.-M. 2006. Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against Erysiphe necator. J. Agric. Food Chem. 54:9119–9125

Belhadj, A., Telef, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S., and Mérillon, J.-M. 2008. Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. Plant Physiol. Biochem. 46:493–9

Bellow, S., Latouche, G., Brown, S. C., Poutaraud, A., and Cerovic, Z. G. 2012. In vivo localization at the cellular level of stilbene fluorescence induced by Plasmopara viticola in grapevine leaves. J. Exp. Bot. 63:3697–3707

Berger, S., Sinha, A. K., and Roitsch, T. 2007. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. J. Exp. Bot. 58:4019–26

Bertelli, E., Surico, G., and Tegli, S. 2000. Sequence Analysis of ITS Ribosomal DNA in Five «Phaeoacremonium» Species and Development of a PCR-Based Assay for the Detection of «P. chlamydosporum» and «P. aleophilum» in Grapevine Tissue. Phytopathol. Mediterr. 39:134–149

Bertsch, C., Ramírez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E., Spagnolo, A., Clément, C., and Fontaine, F. 2013. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. Plant Pathol. 62:243–265

Bhattacharya, A., Sood, P., and Citovsky, V. 2010. The roles of plant phenolics in defence and communication during Agrobacterium and Rhizobium infection. Mol. Plant Pathol. 11:705–19

Blanchette, R. A., and Biggs, A. R. 1992. *Defense mechanisms of woody plants against fungi*. Springer, Berlin.

Blanco-Ulate, B. 2013. Draft genome sequence of the ascomycete Phaeoacremonium aleophilum strain UCR-PA7, a causal agent of the esca disease complex in grapevines. Genome Announc. 1:e00390–13

Bordiec, S., Paquis, S., Lacroix, H., Dhondt, S., Barka, E. A., Kauffmann, S., Jeandet, P., Mazeyrat-Gourbeyre, F., Clement, C., Baillieul, F., and Dorey, S. 2011. Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium Burkholderia phytofirmans strain PsJN and the non-host bacterium Pseudomonas syringae pv. pisi in grapevine cell suspensions. J. Exp. Bot. 62:595–603

Bordiec, S., Rabenoelina, F., Mazeyrat-gourbeyre, F., Clément, C., and Baillieul, F. 2010. RNA Extraction from Grapevine Woody Canes for Gene Expression Analysis by Real-Time RT-PCR. Pages 295–300 in: Methodologies and Results in Grapevine Research, S. Delrot, H. Medrano, E. Or, L. Bavaresco, and S. Grando, eds. Springer Netherlands, Dordrecht.

Bostock, J. M. D., Riley, F. . R. S. H. T., and Esq., B. A. 1855. The Natural History. Pliny the Elder. :Book 17, Chapter 37 Available at: http://www.perseus.tufts.edu/hopper/text?doc=Perseus%3Atext%3A1999.02.0137%3Abook%3D17%3Achapter%3D37 [Accessed October 1, 2012].

Bruez, E. 2013. Etude comparative des communautés fongiques et bactériennes colonisant le bois de ceps de vigne ayant exprimé ou non des symptômes d'esca. :261

Bruez, E., Vallance, J., Gerbore, J., Lecomte, P., Da Costa, J.-P., Guerin-Dubrana, L., and Rey, P. 2014. Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of esca leaf-symptomatic and asymptomatic vines. PLoS One. 9:e95928

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. Phytopathology. 101:S21–S21

Bruez, E., Vallance, J., Gerbore, J., Lecomte, P., Guerin-Dubrana, L., and Rey, P. 2012. Endophytic microflora of woody tissue of healthy and trunk diseased grapevines. Phytopathol. Mediterr. 51:414–415

Bruno, G., and Sparapano, L. 2006. Effects of three esca-associated fungi on Vitis vinifera L.: I. Characterization of secondary metabolites in culture media and host responses to the pathogens in calli. Physiol. Mol. Plant Pathol. 69:209–223

Butault, J.-P., Delame, N., Jacquet, F., and Zardet, G. 2011. L'utilisation des pesticides en France: état des lieux et perspectives de réduction. Notes et études socio-économiques. 35:2–26

Campisano, A., Ometto, L., Compant, S., Pancher, M., Antonielli, L., Yousaf, S., Varotto, C., Anfora, G., Pertot, I., Sessitsch, A., and Rota-Stabelli, O. 2014. Interkingdom Transfer of the Acne-Causing Agent, Propionibacterium acnes, from Human to Grapevine. Mol. Biol. Evol. 31:1059–1065

Castro, A. J., Saladin, G., Bézier, A., Mazeyrat-Gourbeyre, F., Baillieul, F., and Clément, C. 2008. The herbicide flumioxazin stimulates pathogenesis-related gene expression and enzyme activities in Vitis vinifera. Physiol. Plant. 134:453–63

Chen, J. Y., Wen, P. F., Kong, W. F., Pan, Q. H., Zhan, J. C., Li, J. M., Wan, S. B., and Huang, W. D. 2006. Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. Postharvest Biol. Technol. 40:64–72

Chong, J., Le Henanff, G., Bertsch, C., and Walter, B. 2008. Identification, expression analysis and characterization of defense and signaling genes in Vitis vinifera. Plant Physiol. Biochem. 46:469–481

Chong, J., Poutaraud, A., and Hugueney, P. 2009. Metabolism and roles of stilbenes in plants. Plant Sci. 177:143–155

Cleary, M. R., van der Kamp, B. J., and Morrison, D. J. 2012. Effects of wounding and fungal infection with Armillaria ostoyae in three conifer species. II. Host response to the pathogen. For. Pathol. 42:109–123

Compant, S., Brader, G., Muzammil, S., Sessitsch, A., Lebrihi, A., and Mathieu, F. 2013. Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. BioControl. 58:435–455

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., and Barka, E. A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. Appl. Environ. Microbiol. 71:4951–4959

Compant, S., Kaplan, H. H., Sessitsch, A., Nowak, J., Barka, E. A., Ait Barka, E., and Clément, C. 2008. Endophytic colonization of Vitis vinifera L. by Burkholderia phytofirmans strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. FEMS Microbiol. Ecol. 63:84–93

Crisp, P., Wicks, T., Lorimer, M., and Scott, E. 2006. An evaluation of biological and abiotic controls for grapevine powdery mildew. 1. Greenhouse studies. Aust. J. Grape Wine Res. 12:192–202

D'Onofrio, C., Cox, A., Davies, C., and Boss, P. K. 2009. Induction of secondary metabolism in grape cell cultures by jasmonates. Funct. Plant Biol. 36:323–338

Dagostin, S., Schärer, H.-J., Pertot, I., and Tamm, L. 2011. Are there alternatives to copper for controlling grapevine downy mildew in organic viticulture? Crop Prot. 30:776–788

Dai, R., Ge, H., Howard, S., and Qiu, W. 2012. Transcriptional expression of Stilbene synthase genes are regulated developmentally and differentially in response to powdery mildew in Norton and Cabernet Sauvignon grapevine. Plant Sci. 197:70–76

Dangl, J. L., and Jones, J. D. G. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature. 411:826–833

Datta, K., Velazhahan, R., Oliva, N., Ona, I., Mew, T., Khush, G. S., Muthukrishnan, S., and Datta, S. K. 1999. Over-expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhances environmental friendly resistance to Rhizoctonia solani causing sheath blight disease. Theor. Appl. Genet. 98:1138–1145

Derckel, J.-P., Audran, J.-C., Haye, B., Lambert, B., and Legendre, L. 1998. Characterization, induction by wounding and salicylic acid, and activity against Botrytis cinerea of chitinases and beta-1,3-glucanases of ripening grape berries. Physiol. Plant. 104:56–64

Dion, R. 1977. *Histoire de la vigne et du vin en France des origines au XIXe siècle*. Flammarion, [Paris].

Dubos, B. 2002. *Maladies cryptogamiques de la vigne : champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne*. Féret, Bordeaux.

English-Loeb, G., Norton, A. P., Gadoury, D. M., Seem, R. C., and Wilcox, W. F. 1999. Control of Powdery Mildew in Wild and Cultivated Grapes by a Tydeid Mite. Biol. Control. 14:97–103

Estreicher, S. 2014. A Brief History of Wine in South Africa. Eur. Rev. 22:504–537

Evans, K. J., Palmer, A. K., and Metcalf, D. A. 2012. Effect of aerated compost tea on grapevine powdery mildew, botrytis bunch rot and microbial abundance on leaves. Eur. J. Plant Pathol. 135:661–673

Farmer, E., and Ryan, C. 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. Plant Cell Online. 4:129–134

Feechan, A., Anderson, C., Torregrosa, L., Jermakow, A., Mestre, P., Wiedemann-Merdinoglu, S., Merdinoglu, D., Walker, A. R., Cadle-Davidson, L., Reisch, B., Aubourg, S., Bentahar, N., Shrestha, B., Bouquet, A., Adam-Blondon, A.-F., Thomas, M. R., and Dry, I. B. 2013. Genetic dissection of a TIR-NB-LRR locus from the wild North American grapevine species Muscadinia rotundifolia identifies paralogous genes conferring resistance to major fungal and oomycete pathogens in cultivated grapevine. Plant J. 76:661–674

Figueiredo, A., Monteiro, F., Fortes, A. M., Bonow-Rex, M., Zyprian, E., Sousa, L., and Pais, M. S. 2012. Cultivar-specific kinetics of gene induction during downy mildew early infection in grapevine. Funct. Integr. Genomics. 12:379–86

Filippin, L., Jović, J., Cvrković, T., Forte, V., Clair, D., Toševski, I., Boudon-Padieu, E., Borgo, M., and Angelini, E. 2009. Molecular characteristics of phytoplasmas associated with

flavescence dorée in clematis and grapevine and preliminary results on the role of dictyophara europaea as a vector. Plant Pathol. 58:826–837

Fischer, M. 2006. Grapevine wood decay and lignicolous basidiomycetes. Phytopathol. Mediterr. 39:100–106

Fleurat-Lessard, P., Luini, E., Berjeaud, J.-M., and Roblin, G. 2014. Immunological detection of Phaeoacremonium aleophilum, a fungal pathogen found in esca disease. Eur. J. Plant Pathol. 139:137–150

Flor, H. H. 1956. The complementary genetic systems in flax and flax rust. Adv. Genet. 8:29–54

Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R. A., Henrissat, B., Martínez, A. T., Otillar, R., Spatafora, J. W., Yadav, J. S., Aerts, A., Benoit, I., Boyd, A., Carlson, A., Copeland, A., Coutinho, P. M., de Vries, R. P., Ferreira, P., Findley, K., Foster, B., Gaskell, J., Glotzer, D., Górecki, P., Heitman, J., Hesse, C., Hori, C., Igarashi, K., Jurgens, J. A., Kallen, N., Kersten, P., Kohler, A., Kües, U., Kumar, T. K. A., Kuo, A., LaButti, K., Larrondo, L. F., Lindquist, E., Ling, A., Lombard, V., Lucas, S., Lundell, T., Martin, R., McLaughlin, D. J., Morgenstern, I., Morin, E., Murat, C., Nagy, L. G., Nolan, M., Ohm, R. A., Patyshakuliyeva, A., Rokas, A., Ruiz-Dueñas, F. J., Sabat, G., Salamov, A., Samejima, M., Schmutz, J., Slot, J. C., St John, F., Stenlid, J., Sun, H., Sun, S., Syed, K., Tsang, A., Wiebenga, A., Young, D., Pisabarro, A., Eastwood, D. C., Martin, F., Cullen, D., Grigoriev, I. V, and Hibbett, D. S. 2012. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. Science (80-.). 336:1715–9

Fotopoulos, V., Gilbert, M. J., Pittman, J. K., Marvier, A. C., Buchanan, A. J., Sauer, N., Hall, J. L., and Williams, L. E. 2003. The monosaccharide transporter gene, AtSTP4, and the cell-wall invertase, Atbetafruct1, are induced in Arabidopsis during infection with the fungal biotroph Erysiphe cichoracearum. Plant Physiol. 132:821–9

Fourie, P. H., and Halleen, F. 2004. Proactive Control of Petri Disease of Grapevine Through Treatment of Propagation Material. Plant Dis. 88:1241–1245

Fourie, P. H., Hallenn, F., Van der Vyver, J., and Schreuder, W. 2001. Effect of Trichoderma treatments on the occurrence of decline pathogens in the roots and rootstocks of nursery grapevines. Phytopathol. Mediterr. 40:S473–S478

Fujiwara, K., Fujii, T., and Park, J.-S. 2009. Comparison of Foliar Spray Efficacy of Electrolytically Ozonated Water and Acidic Electrolyzed Oxidizing Water for Controlling Powdery Mildew Infection on Cucumber Leaves. Ozone Sci. Eng. 31:10–14

Fujiwara, K., Hayashi, Y., and Park, J.-S. 2011. Spraying Ozonated Water under Well-Ventilated Conditions Does Not Cause Any Visible Injury to Fruit-Vegetable Seedlings. Ozone Sci. Eng. 33:179–182

Gadoury, D., Cadle-Davidson, L., Wilcox, W., Dry, I., Seem, R., and Milgroom, M. 2012. Grapevine powdery mildew (Erysiphe necator): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. Mol. plant …. 13:1–16

Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., and Pugin, A. 2006. Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. Mol. Plant. Microbe. Interact. 19:711–24

Gauthier, A., Trouvelot, S., Kelloniemi, J., Frettinger, P., Wendehenne, D., Daire, X., Joubert, J.-M., Ferrarini, A., Delledonne, M., Flors, V., and Poinssot, B. 2014. The Sulfated Laminarin Triggers a Stress Transcriptome before Priming the SA- and ROS-Dependent Defenses during Grapevine's Induced Resistance against Plasmopara viticola. PLoS One. 9:e88145

Geoffrion, R., and Renaudin, I. 2002. Anti-esca pruning. A useful measure against outbreaks of this old grapevine disease. Phytoma. La Défense des Végétaux. :23–27

Gessler, C., Pertot, I., and Perazzolli, M. 2011. Plasmopara viticola: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. Phytopathol. Mediterr. 50:3–44

Giuliano, S. 2014. Indice de fréquence de traitement (IFT). Pages 200 in: Index des prix et des normes agricoles 2014-2015, Ecole d'Ingénieurs de Purpan, ed. Lavoisier.

Gomès, E. 2009. MOLECULAR ASPECTS OF GRAPEVINE-PATHOGENIC FUNGI INTERACTIONS. Pages 407–428 in: Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology, K.A. Roubelakis-Angelakis, ed. Springer Netherlands, Dordrecht.

Gorfer, M., Klaubauf, S., Bandian, D., and Strauss, J. 2007. Cadophora finlandia and Phialocephala fortinii: Agrobacterium-mediated transformation and functional GFP expression. Mycol. Res. 111:850–5

Graham, T., Zhang, P., Woyzbun, E., and Dixon, M. 2011. Response of hydroponic tomato to daily applications of aqueous ozone via drip irrigation. Sci. Hortic. (Amsterdam). 129:464–471

Gramaje, D., and Armengol, J. 2011. Fungal Trunk Pathogens in the Grapevine Propagation Process: Potential Inoculum Sources, Detection, Identification, and Management Strategies. Plant Dis. 95:1040–1055

Grimmig, B., Nuria Gonzalez-Perez, M., Welzl, G., Penuelas, J., Schubert, R., Hain, R., Heidenreich, B., Betz, C., Langebartels, C., Ernst, D., and Sandermann, H. 2002. Ethylene- and ozone-induced regulation of a grapevine resveratrol synthase gene: different responsive promoter regions. Plant Physiol. Biochem. 40:865–870

Grosman, J., and Doublet, B. 2012. Maladies du bois de la vigne: Synthèse des dispositifs d'observation au vignoble, de l'observatoire 2003-2008 au réseau d'épidémiosurveillance actuel. Phytoma-La Défense des végétaux. 651:31–35

Guerin-Dubrana, L., Labenne, A., Labrousse, J. C., Bastien, S., Rey, P., and Gégout-Petit, A. 2013. Statistical analysis of the grapevines mortality associated with Esca or Eutypa dieback foliar exression. Phytopathol. Mediterr. 51:276–288

Guérin-Dubrana, L., Labenne, A., Labrousse, J. C., Bastien, S., Rey, P., and Gégout-Petit, A. 2013. Statistical analysis of grapevine mortality associated with esca or Eutypa dieback foliar expression. Phytopathol. Mediterr. 52:276–288

Gundlach, H., Muller, M. J., Kutchan, T. M., and Zenk, M. H. 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. 89:2389–2393

Guzel-Seydim, Z. B., Greene, A. K., and Seydim, A. C. 2004. Use of ozone in the food industry. LWT - Food Sci. Technol. 37:453–460

Hartig, R. 1891. *Traité des maladies des arbres*. Traduction. Berger-Levraut, ed.

Hayes, M. A., Davies, C., and Dry, I. B. 2007. Isolation, functional characterization, and expression analysis of grapevine (Vitis vinifera L.) hexose transporters: differential roles in sink and source tissues. J. Exp. Bot. 58:1985–97

Hayes, M. A., Feechan, A., and Dry, I. B. 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. 153:211–21

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology. (N. Y). 11:1026–30

Hou, H., Yan, Q., Wang, X., and Xu, H. 2013. A SBP-Box Gene VpSBP5 from Chinese Wild Vitis Species Responds to Erysiphe necator and Defense Signaling Molecules. Plant Mol. Biol. Report. 31:1261–1270

International Organisation of Vine and Wine. 2013. Statistical report on world vitiviniculture 2013.

Isnard, S., and Silk, W. K. 2009. Moving with climbing plants from Charles Darwin's time into the 21st century. Am. J. Bot. 96:1205–1221

Jaillon, O., Aury, J.-M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Hugueney, P., Dasilva, C., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyère, C., Billault, A., Segurens, B., Gouyvenoux, M., Ugarte, E., Cattonaro, F., Anthouard, V., Vico, V., Del Fabbro, C., Alaux, M., Di Gaspero, G., Dumas, V., Felice, N., Paillard, S., Juman, I., Moroldo, M., Scalabrin, S., Canaguier, A., Le Clainche, I., Malacrida, G., Durand, E., Pesole, G., Laucou, V., Chatelet, P., Merdinoglu, D., Delledonne, M., Pezzotti, M., Lecharny, A., Scarpelli, C., Artiguenave, F., Pè, M. E., Valle, G., Morgante, M., Caboche, M., Adam-Blondon, A.-F., Weissenbach, J., Quétier, F., and Wincker, P. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. Nature. 449:463–7

Jha, A. N., Noditi, M., Nilsson, R., and Natarajan, A. T. 1992. Genotoxic effects of sodium arsenite on human cells. Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen. 284:215–221

Jiménez-Teja, D., Hernández-Galán, R., and Collado, I. G. 2006. Metabolites from Eutypa species that are pathogens on grapes. Nat. Prod. Rep. 23:108–16

Jones, D. H. 1984. Phenylalanine ammonia-lyase : regulation of its induction, and its role in plant development. Phytochemistry. 23:1349–1359

Karban, R., and Baldwin, I. T. 1997. *Induced responses to herbivory*. J.N. Thompson, ed. University of Chicago Press.

Kast, W. K., and Bleyer, K. 2011. Efficacy of sprays applied against powdery mildew (Erysiphe necator) during a critical period for infections of clusters of grapevines (Vitis vinifera). J. Plant Pathol. 93:29–32

Kergresse, M., Rucay, P., Pajot, C., Guillier, M., and Roquelaure, Y. 2011. Cancers cutanés et bronchopulmonaire chez un viticulteur après expositions répétées à l'arsénite de soude. Arch. des Mal. Prof. l'Environnement. 72:281–284

Khadre, M., Yousef, A., and Kim, J. 2001. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. J. Food Sci. 6:1242–1252

Kotze, C., van Niekerk, J. M., Hallenn, F., Mostert, L., and Fourie, P. H. 2011. Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. Phytopathol. Mediterr. 50:247–263

Landi, L., Murolo, S., and Romanazzi, G. 2012. Colonization of Vitis spp. wood by sGFP-transformed Phaeomoniella chlamydospora, a tracheomycotic fungus involved in Esca disease. Phytopathology. 102:290–297

Larignon, P., Fontaine, F., Farine, S., Clément, C., and Bertsch, C. 2009. Esca and Black Dead Arm: two major actors of grapevine trunk diseases. C. R. Biol. 332:765–783

Laveau, C., Letouze, A., Louvet, G., Bastien, S., and Guerin-Dubrana, L. 2009. Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. Phytopathol. Mediterr. 48:32–46

Lecomte, P., Darrieutort, D., Liminana, J.-M., Comont, G., Muruamendiaraz, A., Legorburu, F.-J., Choueiri, E., Jreijiri, F., El Amil, R., and 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, D., Ranjeva, R., and Pugin, A. 2006. Calcium in plant defence-signalling pathways. New Phytol. 171:249–69

Lehoczky, J. 1974. Black dead-arm disease of grapevine caused by Botryosphaeria stevensii infection. Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hungaricae. 9:319–327

Lepoivre, P. 2003. *Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*. De Boeck U.

Lima, M., Ferreres, F., and Dias, A. 2012. Response of *Vitis vinifera* cell cultures to *Phaeomoniella chlamydospora*: changes in phenolic production, oxidative state and expression of defence-related genes. Eur. J. Plant Pathol. 132:133–146

Linder, C., and Jermini, M. 2007. Biologie et distribution du vecteur de la flavescence dorée dans les vignobles. Rev. suisse Vitic. Arboric. …. 39:97–101

Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods San Diego Calif. 25:402–408

Van Loon, L. C., and Van Strien, E. A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiol. Mol. Plant Pathol. 55:85–97

Luini, E., Fleurat-Lessard, P., Rousseau, L., Roblin, G., and Berjeaud, J.-M. 2010. Inhibitory effects of polypeptides secreted by the grapevine pathogens Phaeomoniella chlamydospora and Phaeoacremonium aleophilum on plant cell activities. Physiol. Mol. Plant Pathol. 74:403–411

Magnin-Robert, M., Trotel-Aziz, P., Quantinet, D., Biagianti, S., and Aziz, A. 2007. Biological control of Botrytis cinerea by selected grapevine-associated bacteria and stimulation of chitinase and beta-1,3 glucanase activities under field conditions. Eur. J. Plant Pathol. 118:43–57

Marco, S. Di, Fabio, O., and Mugnai, L. 2011. First studies on the potential of a copper formulation for the control of leaf stripe disease within esca complex in grapevine. Phytopathol. Mediterr. 50:S300–S309

Marrs, K. 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47:127–158

Masih, E. I., Slezack-Deschaumes, S., Marmaras, I., Barka, E. A., Vernet, G., Charpentier, C., Adholeya, A., and 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. Lett. 202:227–232

McGovern, P. E., Glusker, D. L., Exner, L. J., and Voigt, M. M. 1996. Neolithic resinated wine. Nature. 381:480–481

McLean, T., Fourie, P. H., and McLeod, A. 2009. Reporter gene transformation of the trunk disease pathogen Phaeomoniella chlamydospora and biological control agent Trichoderma harzianum. Australas. Plant Pathol. 38:153–167

Meyer, G. De, Bigirimana, J., Elad, Y., and Höfte, M. 1998. Induced systemic resistance in Trichoderma harzianum T39 biocontrol of Botrytis cinerea. Eur. J. Plant Pathol. 104:279–286

Miller, F., Silva, C. M., and Brandão, T. S. 2013. A Review on Ozone-Based Treatments for Fruit and Vegetables Preservation. Food Eng. Rev. 5:77–106

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., and Van Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci. 9:490–498

Mohamed, N., Lherminier, J., Farmer, M. J., Fromentin, J., Beno, N., Houot, V., Milat, M. L., and Blein, J. P. 2007. Defense responses in grapevine leaves against Botrytis cinerea induced by application of a Pythium oligandrum strain or its elicitin, oligandrin, to roots. Phytopathology. 97:611–620

Monteiro, S., Barakat, M., Picarra-Pereira, M. A., Teixeira, A. R., and Ferreira, R. B. 2003. Osmotin and thaumatin from grape: A putative general defense mechanism against pathogenic fungi. Phytopathology. 93:1505–1512

Mori, B., Surico, G., Mugnai, L., Troccoli, L., and Calamassi, R. 2001. Phaeomoniella chlamydospora-grapevine interaction: histochemical reactions to fungal infection. Phytopathologia. 40:400–406

Mostert, L., Groenewald, J. Z., Summerbell, R. C., Gams, W., and Crous, P. W. 2006. Taxonomy and pathology of Togninia (Diaporthales) and its Phaeoacremonium anamorphs. Stud. Mycol. 54:1–113

Mugnai, L., Graniti, A., and Surico, G. 1999. Esca (Black measles) and brown wood-streaking: Two old and elusive diseases of grapevines. Plant Dis. 83:404–418

Murolo, S., and Romanazzi, G. 2014. Effects of grapevine cultivar, rootstock and clone on esca disease. Australas. Plant Pathol. 43:215–221

Mutawila, C., Fourie, P. H., Halleen, F., and Mostert, L. 2011a. Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by Trichoderma species against trunk pathogens. Phytopathol. Mediterr. 50:S264–S276

Mutawila, C., Fourie, P. H., Halleen, F., and Mostert, L. 2011b. Histo-pathology study of the growth of Trichoderma harzianum, Phaeomoniella chlamydospora and Eutypa lata on grapevine pruning wounds. Phytopathol. Mediterr. 50:S46–S60

Nabity, P. D., Haus, M. J., Berenbaum, M. R., and DeLucia, E. H. 2013. Leaf-galling phylloxera on grapes reprograms host metabolism and morphology. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110:16663–8

Ng, C. K.-Y., and McAinsh, M. R. 2003. Encoding specificity in plant calcium signalling: hot-spotting the ups and downs and waves. Ann. Bot. 92:477–85

Van Niekerk, J. M., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Fourie, P. H., and Halleen, F. 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of Botryosphaeria species on grapevines. Mycologia. 96:781–798

OEPP/EPPO. 2008. Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks. EPPO Bull. 38:422–429

Ohashi-Kaneko, K., Yoshii, M., Isobe, T., Park, J.-S., Kurata, K., and Fujiwara, K. 2009. Nutrient Solution Prepared with Ozonated Water does not Damage Early Growth of Hydroponically Grown Tomatoes. Ozone Sci. Eng. 31:21–27

Overton, B. E., Stewart, E. L., Qu, X., Wenner, N. G., and Christ, B. J. 2004. Qualitative Real-Time PCR SYBR Green Detection of Petri Disease Fungi. Phytopathol. Mediterr. 43:403–410

Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P. E., Longa, C. M. O., Yousaf, S., Pertot, I., and Campisano, A. 2012. Fungal endophytic communities in grapevines (Vitis vinifera L.) respond to crop management. Appl. Environ. Microbiol. 78:4308–4317

Park, J.-S., Ishii, M., Okushima, L., Sase, S., and Fujiwara, K. 2008. Effects of Ozonated Water-fog Cooling on Ozone Gas Concentrations and Population Densities of Airborne Bacteria and Fungi on Plant Leaves in a Naturally Ventilated Greenhouse. JARQ. 42:291–297

Paul, B., Chereyathmanjiyil, A., Masih, I., Chapuis, L., and BenoÄ±Ì‚,t, 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. Lett. 165:65–70

Pearce, R. B. 1996. Antimicrobial defences in the wood of living trees. New Phytol. 132:203–233

Perazzolli, M., Bampi, F., Faccin, S., Moser, M., De Luca, F., Ciccotti, A. M., Velasco, R., Gessler, C., Pertot, I., and Moser, C. 2010. Armillaria mellea induces a set of defense genes in grapevine roots and one of them codifies a protein with antifungal activity. Mol. Plant. Microbe. Interact. 23:485–96

Perazzolli, M., Roatti, B., Bozza, E., and Pertot, I. 2011. Trichoderma harzianum T39 induces resistance against downy mildew by priming for defense without costs for grapevine. Biol. Control. 58:74–82

Péros, J.-P., Berger, G., and Jamaux-Despréaux, I. 2008. Symptoms, Wood Lesions and Fungi Associated with Esca in Organic Vineyards in Languedoc-Roussillon (France). J. Phytopathol. 156:297–303

Poinssot, B., Vandelle, E., Bentejac, M., Adrian, M., Levis, C., Brygoo, Y., Garin, J., Sicilia, F., Coutos-Thevenot, P., and Pugin, A. 2003. The endopolygalacturonase 1 from Botrytis cinerea activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. Mol. Plant-Microbe Interact. 16:553–564

Polesani, M., Bortesi, L., Ferrarini, A., Zamboni, A., Fasoli, M., Zadra, C., Lovato, A., Pezzotti, M., Delledonne, M., and 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 Genomics. 11:117

Pouzoulet, J. 2012. Développement d'une métodologie PCR en temps réel pour la détection et la quantification in planta des principaux champignons pathogènes associés aux maladies du bois de la vigne. :177

Pouzoulet, J., Jacques, A., Besson, X., Dayde, J., and Mailhac, N. 2013a. Histopathological study of response of Vitis vinifera cv. Cabernet Sauvignon to bark and wood injury with and without inoculation by Phaeomoniella chlamydospora. Phytopathol. Mediterr. 52:313–323

Pouzoulet, J., Mailhac, N., Couderc, C., Besson, X., Daydé, J., Lummerzheim, M., and Jacques, A. 2013b. A method to detect and quantify Phaeomoniella chlamydospora and Phaeoacremonium aleophilum DNA in grapevine-wood samples. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97:10163–75

Pozzebon, A., and Duso, C. 2008. Grape downy mildew Plasmopara viticola, an alternative food for generalist predatory mites occurring in vineyards. Biol. Control. 45:441–449

Pryor, W., Squadrito, G., and Friedman, M. 1995. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. Free Radic. Biol. Med. 19:935–941

Punt, W., Marks, A., and Hoen, P. P. 2003. VITACEAE. Rev. Palaeobot. Palynol. 123:67–70

Puopolo, G., Giovannini, O., and Pertot, I. 2014. Lysobacter capsici AZ78 can be combined with copper to effectively control Plasmopara viticola on grapevine. Microbiol. Res. 169:633–42

Putz, F., and Mooney, H. 1991. *The biology of vines*. Cambridge University Press.

R Core Team. 2013. R: A Language and Environment for Statistical Computing.

Rabea, E. I., Badawy, M. E.-T., Stevens, C. V, Smagghe, G., and Steurbaut, W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. Biomacromolecules. 4:1457–65

Raven, P. H., Evert, R. F., Eichhorn, S. E., and Bouharmont, J. 2003. *Biologie végétale*. De Boeck.

Repka, V., Fischerová, I., and Šilhárová, K. 2004. Methyl Jasmonate is a Potent Elicitor of Multiple Defense Responses in Grapevine Leaves and Cell-Suspension Cultures. Biol. Plant. 48:273–283

Restaino, L., Frampton, E. W., Hemphill, J. B., and Palnikar, P. 1995. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 61:3471–5

Retief, E., Damm, U., van Niekerk, J. M., McLeod, A., and Fourie, P. 2005. A protocol for molecular detection of Phaeomoniella chlamydospora in grapevine wood. S. Afr. J. Sci. 101:139–142

Reynier, A. 2011. *Manuel de viticulture: guide technique du viticulteur*. Lavoisier, ed.

Ridgway, H. J., Sleight, B. E., and Stewart, A. 2002. Molecular evidence for the presence of Phaeomoniella chlamydospora in New Zealand nurseries, and its detection in rootstock mothervines using species-specific PCR. Australas. plant Pathol. 31:267–271

Ridgway, H. J., Steyaert, J. M., Pottinger, B. M., Carpenter, M., Nicol, D., and Stewart, A. 2005. Development of an isolate-specific marker for tracking Phaeomoniella chlamydospora infection in grapevines. Mycologia. 97:1093–101

Robert, N., Ferran, J., Breda, C., Coutos-Thevenot, P., Boulay, M., Buffard, D., Esnault, R., and Coutos-Thévenot, P. 2001. Molecular characterization of the incompatible interaction of vitis vinifera leaves with Pseudomonas syringae pv. pisi: Expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein. Eur. J. Plant Pathol. 107:249–261

Robinson, R. M., Morrison, D. J., and Jensen, G. D. 2004. Necrophylactic periderm formation in the roots of western larch and Douglas-fir trees infected with Armillaria ostoyae. II. The response to the pathogen. For. Pathol. 34:119–129

Roitsch, T., Balibrea, M. E., Hofmann, M., Proels, R., and Sinha, A. K. 2003. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. J. Exp. Bot. 54:513–524

Roth, J., and Sullivan, D. 1981. Solubility of ozone in water. Ind. Eng. Chem. Fundam. 20:137–140

Rumbolz, J., and Gubler, W. 2005. Susceptibility of grapevine buds to infection by powdery mildew Erysiphe necator. Plant Pathol. 54:535–548

Ryan, C. 1978. Proteinase inhibitors in plant leaves: A biochemical model for pest-induced natural plant protection. Trends Biochem. Sci. 3:148–150

Sandermann, H., Ernst, D., Heller, W., and Langebartels, C. 1998. Ozone: An abiotic elicitor of plant defence reactions. Trends Plant Sci. 3:47–50

Sanders, D., Brownlee, C., and Harper, J. 1999. Communicating with Calcium. Plant Cell. 11:691–706

Savocchia, S., Mandel, R., Crisp, P., and Scott, E. S. 2010. Evaluation of “alternative” materials to sulfur and synthetic fungicides for control of grapevine powdery mildew in a warm climate region of Australia. Australas. Plant Pathol. 40:20–27

Schoedl, K., Schuhmacher, R., and Forneck, A. 2012. Studying the polyphenols of grapevine leaves according to age and insertion level under controlled conditions. Sci. Hortic. (Amsterdam). 141:37–41

Schoonhoven, L. M., Van Loon, J. J. A., and Dicke, M. 2005. *Insect-plant biology*. Oxford University Press.

Sheehan, D., Meade, G., Foley, V., and Dowd, C. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochem. J. 360:1–16

Sherson, S. M., Alford, H. L., Forbes, S. M., Wallace, G., and Smith, S. M. 2003. Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of Arabidopsis. J. Exp. Bot. 54:525–531

Shigo, A. L., and Marx, H. G. 1977. Compartmentalization of decay in trees. Sci. Am. 252:73

Smith, K. T. 2006. Compartmentalization today. Arboric. J. 29:173–184

Solla, A., Tomlinson, F., and Woodward, S. 2002. Penetration of Picea sitchensis root bark by Armillaria mellea, Armillaria ostoyae and Heterobasidion annosum. For. Pathol. 32:55–70

Southerton, S. G. 1998. Eucalypt MADS-Box Genes Expressed in Developing Flowers. PLANT Physiol. 118:365–372

Spagnolo, A., Magnin-Robert, M., Alayi, T. D., Cilindre, C., Mercier, L., Schaeffer-Reiss, C., Van Dorsselaer, A., Clément, C., and Fontaine, F. 2011. Physiological Changes in Green Stems of Vitis vinifera L. cv. Chardonnay in Response to Esca Proper and Apoplexy Revealed by Proteomic and Transcriptomic Analyses. J. Proteome Res. 11:461–475

Staehelln, J., and Hoigné, J. 1982. Decomposition of Ozone in Water: Rate of Initiation by Hydroxide Ions and Hydrogen Peroxide. Environ. Sci. Technol. 16:676–681

Sun, Q., Rost, T. L., Reid, M. S., and Matthews, M. A. 2007. Ethylene and not embolism is required for wound-induced tylose development in stems of grapevines. Plant Physiol. 145:1629–36

Surico, G. 2001. Towards Commoly Agreed Answers to Some Basic Questions on Esca. Phytopathol. Mediterr. 40:S487–S490

Tang, K., Fang, F., Yang, H. R., and Huang, W. D. 2011. Effect of UV-C Irradiation on Stilbene Synthase Localization in Young Grape Plants. Russ. J. Plant Physiol. 58:603–614

Terrier, N., Glissant, D., Grimplet, J., Barrieu, F., Abbal, P., Couture, C., Ageorges, A., Atanassova, R., Léon, C., Renaudin, J.-P., Dédaldéchamp, F., Romieu, C., Delrot, S., and Hamdi, S. 2005. Isogene specific oligo arrays reveal multifaceted changes in gene expression during grape berry (*Vitis vinifera* L.) development. Planta. 222:832–847

This, P., Lacombe, T., and Thomas, M. R. 2006. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. Trends Genet. 22:511–519

Thomma, B., Penninckx, I., Cammue, B., and Broekaert, W. 2001. The complexity of disease signaling in Arabidopsis. Curr. Opin. Immunol. 13:63–68

Tippett, J. 1981. Barrier zone formation: a mechanism of tree defense against vascular pathogens. IAWA Bull. 2:2–7

Toffolatti, S. L., Venturini, G., Maffi, D., and Vercesi, A. 2012. Phenotypic and histochemical traits of the interaction between Plasmopara viticola and resistant or susceptible grapevine varieties. BMC Plant Biol. 12:124

Trdá, L., Fernandez, O., Boutrot, F., Héloir, M.-C., Kelloniemi, J., Daire, X., Adrian, M., Clément, C., Zipfel, C., Dorey, S., and Poinssot, B. 2014. The grapevine flagellin receptor VvFLS2 differentially recognizes flagellin-derived epitopes from the endophytic growth-promoting bacterium Burkholderia phytofirmans and plant pathogenic bacteria. New Phytol. 201:1371–84

Turner, J., Ellis, C., and Devoto, A. 2002. The jasmonate signal pathway. Plant Cell. 14:S153–S164

Urbez-Torres, J. R. 2011. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. Phytopathol. Mediterr. 50:S5–S45

Urbez-Torres, J. R., and Gubler, W. D. 2009a. Double pruning as a potential method to control Bot canker disease of grapes and duration of susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by Botryosphaeriaceae. Phytopathol. Mediterr. 99:S186–S187

Urbez-Torres, J. R., and Gubler, W. D. 2009b. Pathogenicity of Botryosphaeriaceae Species Isolated from Grapevine Cankers in California. Plant Dis. 93:584–592

Urbez-Torres, J. R., and Gubler, W. D. 2011. Susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by Lasiodiplodia theobromae and Neofusicoccum parvum. Plant Pathol. 60:261–270

Urbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Voegel, T. M., Gubler, W. D., Pathology, P., Cooperative, C., and Niekerk, F. 2006. Identification and distribution of Botryosphaeria spp. associated with grapevine cankers in California. Plant Dis. 90:1490–1503

Valtaud, C., Larignon, P., Roblin, G., and Fleurat-Lessard, P. 2009. Developmental and ultrastructural features of Phaeomoniella chlamydospora and Phaeoacremonium aleophilum in relation to xylem degradation in Esca disease of the grapevine. J. Plant Pathol. 91:37–51

Varnier, A.-L., Sanchez, L., Vatsa, P., Boudesocque, L., Garcia-Brugger, A., Rabenoelina, F., Sorokin, A., Renault, J.-H., Kauffmann, S., Pugin, A., Clement, C., Baillieul, F., and Dorey,

S. 2009. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to Botrytis cinerea in grapevine. Plant Cell Environ. 32:178–193

Wahlström, K. T., and Johansson, M. 1992. Structural responses in bark to mechanical wounding and Armillaria ostoyae infection in seedlings of Pinus sylvestris. For. Pathol. 22:65–76

Waite, H. E., and Morton, L. U. 2007. Hot water treatment , trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material. Phytopathol. Mediterr. 46:5–17

Weber, E. A., Trouillas, F. P., and Gubler, W. D. 2007. Double Pruning of Grapevines: A Cultural Practice to Reduce Infections by Eutypa lata. Am. J. Enol. Vitic. 58:61–66

Wedemeyer, G. A., Nelson, N. C., and Smith, C. A. 1978. Survival of the Salmonid Viruses Infectious Hematopoietic Necrosis (IHNV) and Infectious Pancreatic Necrosis (IPNV) in Ozonated, Chlorinated, and Untreated Waters. J. Fish. Res. Board Canada. 35:875–879

Whiteman, S. A., Jaspers, M. V., Stewart, A., Ridgway, H. J., and Zydenbos, S. M. 2002. Detection of Phaeomoniella chlamydospora in soil using species-specific PCR. Pages 139–145 in: New Zealand Plant Protection Volume 55, 2002. Proceedings of a conference, Centra Hotel, Rotorua, New Zealand, 13-15 August 2002., New Zealand Plant Protection Society.

Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F. M. 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. Nature. 414:562–5

Wunderlich, N., Ash, G. J., Steel, C. C., Raman, H., Cowling, A., and Savocchia, S. 2011. Refining the biological factors affecting virulence of Botryosphaeriaceae on grapevines. Ann. Appl. Biol. 159:467–477

Young, S. B., and Setlow, P. 2004. Mechanisms of Bacillus subtilis spore resistance to and killing by aqueous ozone. J. Appl. Microbiol. 96:1133–42

Zamboni, A., Gatto, P., Cestaro, A., Pilati, S., Viola, R., Mattivi, F., Moser, C., and Velasco, R. 2009. Grapevine cell early activation of specific responses to DIMEB, a resveratrol elicitor. BMC Genomics. 10:363

Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X., and Dong, X. 1999. Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. Proc. Natl. Acad. Sci. 96:6523–6528

Zipfel, C., and Robatzek, S. 2010. Pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity: veni, vidi...? Plant Physiol. 154:551–4

Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E. J., Jones, J. D. G., Felix, G., and Boller, T. 2004. Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. Nature. 428:764–7

Curriculum vitae

PROJET PROFESSIONNEL

Enseignant-Chercheur : étude écogénomique des interactions entre la plante et la biocœnose environnante (champignons, bactéries, nématodes, insectes, facteurs abiotiques). Caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans ces interactions afin de développer des traitements alternatifs pour une agriculture durable.

FORMATION

Double diplôme de 2em cycle :

2005-2011 Ingénieur en agriculture de l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan

2009-2011 Master Plant Sciences: Phytopathology and Entomology at Wageningen University (Pays-Bas)

3em cycle :

2011-2014 Doctorat de l'INP-Toulouse au sein de l'école doctorale SEVAB axe « Interactions plantes-microorganismes », réalisé à l'INP–EI Purpan, supervisé par Dr. Frédéric Violleau, Dr. Alban Jacques et Dr. Stéphane Compant. Financement Région Midi-pyrénées/EI Purpan.

"Esca et vigne : compréhension des mécanismes de défense précoces du bois de la vigne *Vitis vinifera* L. suite à la maladie, colonisation des champignons *in planta* et proposition de moyens de lutte pour une viticulture durable."

EXPERIENCES D'ENSEIGNEMENT

2013-2014 Intervenant dans l'option Métabolites secondaires chez les plantes cultivées à l'EI Purpan (4h)

2011-2013 Chargé de Travaux dirigés de Physiologie Végétale à l'EI Purpan (40h)

2013 Formation « Vulgarisation scientifique » de l'école doctorale SEVAB (12h)

2013 Intervention en seconde générale et terminale S du lycée agricole d'Auzeville (1 journée)

2012 Chargé de Travaux Pratiques de Physiologie Végétale à l'EI Purpan (16h)

2012 Chargé de Travaux Pratique de Pédologie à l'EI Purpan (4h)

2012 Accompagnateur semaine CREDIGE biodiversité (1 journée)

ENCADREMENT D'ETUDIANTS

Aleksandar Mihajlovski en Master 2 Plant Sciences : Phytopathology à l'université de Wageningen (NL)

Pamela Bruno élève ingénieure à l'Universidad Nacional de Cuyo (Argentine)

Meng Chen en Master Plant Sciences : Plant breeding à l'université de Wageningen (NL)

Yanru Song en Master Plant Sciences : Plant breeding à l'université de Wageningen (NL)

Ingrid Prunet-Foch en Parcours Recherche en 4em année à l'EI Purpan

Fouad Bouazizi en Master 1 Micro-organismes, hôtes et Environnements à l'Université Montpellier 2

EXPERIENCES DE RECHERCHE

	Compétences
2011-2014 Thèse de doctorat à l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan (EIP, Toulouse) "Esca et vigne : compréhension des mécanismes de défense précoces du bois de la vigne *Vitis vinifera* L. suite à la maladie, colonisation des champignons *in planta* et proposition de moyens de lutte pour une viticulture durable."	
-Développement d'un modèle d'étude des maladies du bois de la vigne au laboratoire -Etude de la réponse de la vigne face aux champignons associés à l'esca -Mesure de la croissance des champignons associés à l'esca *in planta* -Développement d'un traitement antifongique durable en pépinière viticole : désinfection des plaies de tailles à l'eau ozonée -Test d'agents antifongiques sur le modèle d'étude développé	Phytopathologie RT-qPCR qPCR multiplex Ozonation Microbiologie Prestation de services
2013 Mobilité de 3 mois à l'Austrian Institute of Technology (BOKU et AIT, Vienne, Autriche).	
-Localisation des champignons associés à l'esca dans le bois de la vigne. -Développement d'outils d'observation spécifiques des champignons du bois de la vigne *in planta*.	Transformation GFP Microscopie FISH et Microscopie confocale
2011 Stage de 4 mois à l'Université Rennes 1 au Laboratoire d'écobiologie des insectes parasitoïdes, encadré par Anne Marie CORTESERO	
Facteurs influençant la recherche de l'hôte chez la larve du coléoptère parasitoïde *Aleochara bipustulata* -Développement de test en olfactomètre -Mise en évidence du rôle de la plante dans l'orientation de la recherche de l'auxiliaire *Aleochara bipustulata*.	Ecologie chimique Ethologie

2010 Mémoire de Master en double diplôme (7 mois) au Laboratoire d'Entomologie de l'université de Wageningen dans l'équipe de Dr. Erik POELMAN and Pr. Dr. Marcel DICKE	
Approche écogénomique des interactions indirectes via la plante entre les guêpes parasitoïdes *C. rubecula* and *M. mediator*	Entomologie Statistiques
2009 Formation intensive en Nématologie à l'Université de Wageningen	
Localisation des sites d'hivernation des nématodes entomopathogènes	Nématologie

AUTRES

Langues étrangères: Anglais lu, parlé et écrit couramment (TOIEC 845) présentations scientifiques et réunions d'équipe en anglais - Espagnol basique

Informatiques: Pack office, statistiques sur SPSS et apprentissage du langage R

Sport: Randonnée, vélo

Activités: improvisation théâtrale, guitare, naturalisme

Publications

R. Pierron, S. Compant, J. Pouzoulet, H. Berger, W. D. Gubler, M. Gorfer, A. Sessitsch, J. Strauss and A. Jacques. In-depth knowledge of the black box of Esca disease in grapevine, a requirement for the complex pathosystem's understanding and for future prospects. (en préparation).

R. Pierron, M. Gorfer, H. Berger, A. Jacques, A. Sessitsch, J. Strauss and S. Compant. **2015**. Deciphering the niches of colonisation of *Vitis vinifera* L. by the esca–associated fungus *Phaeoacremonium aleophilum* using a *gfp* marked strain and cutting systems. *PlosOne* (in press).

R. Pierron, M. Pages, C. Couderc, S. Compant, A. Jacques and F. Violleau. **2015**. *In vitro* and *in planta* fungicide properties of ozonated water against the esca-associated fungus *Phaeoacremonium aleophilum*. *Scientia Horticulturae* (in press).

R. Pierron, J. Pouzoulet, A. Meziane, N. Mailhac and A. Jacques. A model for biological control studies of grapevine trunk diseases under laboratory conditions. In « Recent advances on biological control of grapevine diseases: from fundamental knowledge to application in the vineyards » Eds S. Compant and F. Mathieu, CABI publisher.

M. Pagès, D. Kleiber, **R. Pierron** and F. Violleau. *In vitro* tests of ozone effects on *Botrytis cinerea* conidia. (Soumis à *LWT - Food Science and Technology*).

Communications orales

9th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases, Adelaide, Australia, November 2014

R. Pierron, M. Gorfer, H. Berger, A. Jacques, A. Sessitsch, J. Strauss and S. Compant. **2014**. Visualization of internodal and nodal colonization of *Vitis vinifera* L. by *Phaeoacremonium aleophilum* using a *gfp* marker. *Phytopathologia Mediterranea* 53(3):565-592.

R. Pierron, M. Pages, C. Couderc, S. Compant, A. Jacques and F. Violleau. **2014**. Protection of *Vitis vinifera* L. pruning wounds from *Phaeoacremonium aleophilum* using ozonated water: A solution for integrated esca-associated fungi management in grapevine nurseries? *Phytopathologia Mediterranea* 53(3):565-592.

Workshop on Biotechnological Control of Plant Diseases at Vienna (BOKU, Austria), October 2013

H. Berger, S. Compant, L. Antonielli, E. Wischnitzki, M. Gorfer, **R. Pierron**, G. Brader, A. Sessitsch and J. Strauss. Molecular characterization of fungal grapevine trunk disease strains in respect to fungicide and biocontrol treatment.

IOA & IUVA World Congress in Las Vegas, Nevada, September 2013

R. Pierron, Y. Song, A. Jacques and F. Violleau. Ozonated water as a potential biological control agent : Pruning wound protection of *Vitis vinifera* against the Esca-associated fungi *Phaeoacremonium aleophilum*.

International Symposium on Field- and Flow-based Separations FFF, Pau, France July 2013

R. Pierron, M. Pagès, M. Gaucher-Delmas, D. Kleiber, F. Violleau and A. Jacques. Size separation of fungal spores and conidia using Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation in steric/hyperlayer mode.

8th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases, Valencia, Spain, June 2012

R. Pierron, A. Jacques and S. Compant. **2012**. Short time kinetics of defence responses induced by *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora* in *Vitis vinifera* L. *Phytopathologia Mediterranea* 51(2):410-452.

Posters

XIII Meeting of the IOBC Working Group, Uppsala, Sweden, June 2014

R. Pierron, M. Gorfer, H. Berger, A. Jacques, A. Sessitsch, J. Strauss and S. Compant. Visualization of internodal and nodal colonization of *Vitis vinifera* L. by *Phaeoacremonium aleophilum*, one causal agent of esca trunk disease, using a *gfp* marker.

XV International Society of Molecular Plant-Microbe Interaction, Kyoto, Japan, July 2012

J. Pouzoulet, **R. Pierron**, S. Compant, N. Mailhac and A. Jacques. Tracking of Esca causal agents, *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*, in young vine plants.