



INSTITUT FRANÇAIS DE LA VIGNE ET DU VIN

LES MALADIES DU BOIS DE LA VIGNE

17 – 18 novembre 2015

Colmar

(Université Haute-Alsace)



COMPTE RENDU

PROGRAMME DES JOURNEES MALADIES DU BOIS

17 – 18 novembre 2015

Université de Haute-Alsace

Mardi 17 novembre 2015

8h30 -12h30 – Observatoire, nuisibilité, étiologie, écologie microbienne, épidémiologie

- + Tour d'horizon des dépérissements sur jeunes plantations (Larignon Philippe, IFV) (20 min)
- + Etat des lieux - Observations du vignoble (Doublet Bruno, DRAAF/SRAL) (20 min)
- + Effet de l'esca sur la qualité des raisins et des vins (Michaël Jourdes remplace Teissède Jean-Louis, Université de Bordeaux) (10 min)
- + Avancement modèle conceptuel sur les maladies du bois (Claverie Marion, IFV) (20 min)
- + Partage d'observations de terrain et apport au modèle conceptuel (Claverie Marion, IFV) (20 min)

10h30 – 10h50 Pause

- + Cycle biologique des champignons associés aux maladies du bois (Larignon Philippe, IFV) (20 min)
- + Les réseaux microbiens colonisant le bois de ceps de vigne atteint ou non par l'esca : stabilité et évolution temporelle (Bruez Emilie, UMR INRA SAVE / Bordeaux Sciences Agro) (15 min)
- + Symptomatologie et étude de la microflore colonisant les ceps âgés du vignoble Louis Pasteur à Arbois (Renault David, UMR INRA SAVE / Bordeaux Sciences Agro) (15 min)
- + Etude de la dynamique temporelle et spatio-temporelle de l'esca de la vigne (Guérin-Dubrana Lucia UMR INRA SAVE / Bordeaux Sciences Agro) (10 min)

12h30 – 14h - Buffet

14 h – 18 h 30 – (suite) - Interaction hôte-pathogènes

- + Rôle de la conduite (Lecomte Pascal, UMR INRA SAVE / Bordeaux Sciences Agro) (20 min)
- + Impact du porte-greffe sur l'expression des symptômes foliaires (Laveau Coralie, VITINNOV) (20 min)
- + Impact du type de greffe sur l'expression des symptômes foliaires (Mary Séverinne, VITINNOV) (10 min)

+ Diversité et trait d'histoire de vie des *Botryosphaeriaceae* dans le vignoble français (Comont Gwenaëlle, UMR INRA SAVE / Bordeaux Sciences Agro) (15 min)

+ Phytotoxines de *Neofusicoccum parvum* (Abou-Mansour Eliane, Université de Fribourg, CH) (20 min)

+ Pathogénie des composés extracellulaires de 2 champignons impliqués dans MDB (Farine Sybille, UHA) (15 min)

16h – 16h30 - Pause

+ Réactions de défenses induites par les composés extracellulaires des Botryosphaeriaceées sur les cultures cellulaires de *V. vinifera* (Stempien Elodie, UHA) (20 min)

+ Processus de détoxification mis en place par *Vitis vinifera* contre les toxines fongiques (Trotel-Aziz Patricia, URCA) (15 min)

+ Le génôme de *Diplodia seriata* (Lebrun Marc-Henri INRA BIOGER Versailles) (15 min)

+ Mise au point d'une technique d'hybridation *in situ* visant la co-localisation *in planta* des *Botryosphaeriaceae* et de marqueurs de défense (Douillet Antonin ? IFV/UMR Agroécologie Dijon) (15 min)

+ Marqueurs génétiques et physiologiques de la sensibilité de la vigne à *Eutypa lata* (Cardot Chloé, Université Poitiers/BNIC) (15 min)

+ Etude de nouvelles composantes de l'agressivité d'*Eutypa lata*, cryptogame vasculaire responsable de l'eutypiose (Bidel Luc, INRA, UMR AGAP) (10 min)

+ Recherche de sources de résistance à 3 champignons pionniers et étude des composantes de l'agressivité chez *Eutypa lata* (Moisy Cédric, INRA AGAP) (20 min)

Soirée libre

Mercredi 18 novembre 2015

8h30 -12h30 – Interaction hôte-pathogènes – Méthodes de lutte

+ Recherche de sources de résistance aux *Botryosphaeriaceae* chez la vigne : Etude de *Vitis vinifera* spp. *sylvestris* (Chong Julie, UHA) (15 min)

+ Développement d'un modèle simplifié pour l'étude des champignons à l'esca *in planta* (Jacques Alban, INP – EI – Purpan) (20 min)

+ L'arsénite de sodium et les maladies du bois : introduction et son effet sur la microflore (Larignon Philippe, IFV) (20 min)

+ Efficacité de l'arsénite de sodium envers les maladies du bois de la vigne (Goddard Mary-Lorène, UHA) (20 min)

10h30 – 11h - Pause

+ Résultats préliminaires de l'effet de l'arsénite de sodium sur la physiologie de la plante (Vallet Julie, URCA) (15 min)

+ Caractérisation des modifications tissulaires et cellulaires induites chez la vigne suite à un traitement arsénite de sodium (Douillet Antonin, IFV/UMR Agroécologie Dijon) (15 min)

+ Comment appréhender les maladies du bois ? (Péros Jean-Pierre, INRA AGAP) (20 min)

+ Influence de facteurs environnementaux et de pratiques culturales sur l'expression des maladies du bois et interaction plante – microbiote (Projet Hennessy) (Rey Patrice, UMR INRA SAVE / Bordeaux Sciences Agro) (15 min)

12h30 – 14h - Buffet

14 h – 18 h 30 – Méthodes de lutte

+ Synthèse et étude du transport de profongicides en vue de contrôler les maladies vasculaires (Wu Hanxiang, Université de Poitiers) (15 min)

+ Mise au point d'un modèle simplifié en vue de tester des moyens de lutte (Spagnolo Alessandro, URCA) (20 min)

+ Vers un nouveau traitement phytopharmaceutique contre les maladies du bois (Gellon Mélanie, UHA) (15 min)

+ Colonisation de la rhizosphère de jeunes plants de vigne greffés par l'agent de biocontrôle contre *Phaeomoniella chlamydospora* (Yacoub Amira, UMR INRA SAVE / Bordeaux Sciences Agro) (15 min)

+ Screening de bactéries antagonistes de deux champignons impliqués dans les maladies du bois de la vigne (Haidar Rana, UMR INRA SAVE / Bordeaux Sciences Agro) (15 min)

16h – 16h30 Pause

+ Les stilbénoides de la vigne : Biopesticides ? Des nouveaux Leads prometteurs (Coutos-Thévénat Pierre, Université de Poitiers) (15 min)

+ Expérimentation de stratégies pouvant diminuer les symptômes des maladies du bois (Grosjean Claire, CRA Bourgogne) (15 min)

+ Influence du fonctionnement interne du cep sur l'expression des symptômes Esca/BDA (Delorme Gaël, SVJ/GDA 39) (15 min)

+ Curetage des ceps malades et synthèse des observations terrain et pistes de réflexion (Thibault Marie, SICAVAC) (15 min)

Tour d'horizon des maladies touchant les jeunes plantations

Philippe Larignon

IFV Pôle Rhône-Méditerranée, 7 avenue Cazeaux, 30230 Rodilhan.

Contact : philippe.larignon@vignevin.com

Partenaires (échantillons, analyses SSCP) : Gaël Delorme (CA39), Vincent Dumot (BNIC), Christophe Terrier (FDCETA 17), Guillaume Morvan et Claire Grosjean (CA Bourgogne), François Dal (SICAVAC), Emilie Bruez et Patrice Rey (UMR Bordeaux Sciences Agro/INRA SAVE Bordeaux)

Les maladies du bois touchent les jeunes plantations âgées de 2 à 7-8 ans, qui se caractérisent par un affaiblissement de la végétation, conduisant inévitablement à la mort des jeunes plantes ou par des apoplexies plus ou moins totales. Les maladies identifiées en France sont :

- + le Pied noir (affaiblissement du cep, double plateau de racines, nécroses partant du talon et remontant dans le porte-greffe), lié à l'*Ilyonectria liriodendri*,
- + la Verticilliose (secteurs nécrotiques sur les feuilles, dessèchement des fruits ou inflorescences, dessèchement des rameaux ne portant ni fruits, ni feuilles), liée au *Verticillium longisporum*,
- + les dépérissements liés aux *Phomopsis* spp. (rabougrissement des rameaux, folletage des rameaux peu développés, nécrose brune en position sectorielle),
- + les dépérissements liés à *Neofusicoccum parvum* (défoliation des rameaux, tigrures sur feuilles, bande brune, nécroses sectorielles de couleur grise).

En 2013 et 2014, les études ont porté sur plusieurs types de symptomatologie.

Le premier, observé dans le vignoble du Jura, se caractérise par la présence de petites taches jaunes sur les feuilles qui peuvent se développer pour former des symptômes similaires aux premiers symptômes de l'esca. Des coupes transversales réalisées dans de tels ceps montrent de très nombreuses ponctuations de couleur brune. Les analyses microbiologiques révèlent que les champignons associés aux maladies du bois ne sont pas responsables de cette symptomatologie, elles montrent que de nombreuses bactéries sont trouvées. Des analyses complémentaires par une méthode de biologie moléculaire (SSCP) indiquent que la communauté fongique est différente d'une parcelle à une autre alors que celle de nature bactérienne est plus similaire entre les parcelles. Ces études se poursuivent.



Jura : A gauche et au milieu, symptômes similaires aux premiers symptômes de l'esca. A droite, très nombreuses ponctuations de couleur brune dans le greffon. (Crédit photo : IFV – Philippe Larignon)

Le deuxième, observé dans le vignoble du Sancerre sur du Sauvignon/41B se caractérise par des symptômes foliaires ou des défoliations. Dans le bois cela se traduit par la présence de nécroses de couleur brune. Les analyses révèlent la présence de *Verticillium*

longisporum (responsable de la verticilliose décrite pour la première fois dans le vignoble de Chablis en 2008).

Le troisième symptôme foliaire, type tigrures de feuilles, est observé dans le vignoble de Cognac. Vu le faible nombre de plantes, il est difficile d'associer un agent pathogène ou plusieurs aux symptômes observés car ils ne sont pas trouvés sur toutes les plantes analysées. Les analyses microbiologiques montrent la présence de *Cadophora* sp., *Tetracoccusporium* sp., *Phaeomoniella chlamydospora*, différentes bactéries, ...

Enfin, une tigrure des feuilles a pu être associée à *Diplodia mutila*. Ce champignon est trouvé dans les nécroses qui partent des bourgeons. Son caractère pathogène est montré sur des rameaux de cépage mourvèdre inoculés au champ (stade floraison). Ils provoquent les symptômes dans le bois des nécroses sectorielles similaires à celles observées *in natura*.

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce à la participation du CASDAR.

État des lieux du vignoble - Résultats issus des dispositifs d'observation

Bruno Doublet¹ et Jacques Grosman²

¹DRAAF SRAL Champagne Ardenne - Lorraine – Alsace, 37 av Hoche - CS 30 004
51686 Reims Cédex 2

²DRAAF SRAL Rhône-Alpes, 165 rue de Garibaldi BP 3202, 69401 LYON CEDEX 03

Contact : bruno.doublet@agriculture.gouv.fr

L'esca, le black dead arm et, dans une moindre mesure, l'eutypiose, représentent l'une des principales préoccupations phytosanitaires du vignoble français, européen mais aussi mondial. Cette problématique viticole s'inscrit également, pour une grande part, dans celle plus globale imputée aux dépérissements.

Aussi, la connaissance objective, partagée et actualisée de l'état des lieux dans les principaux bassins viticoles demeure un pré-requis. Les données recueillies proviennent pour une grande part des réseaux d'épidémiosurveillance, intégrés dans le dispositif national de surveillance biologique du territoire (axe 5 du plan Ecophyto). Pour une autre part, elles sont issues de dispositifs de type Observatoire dédié maladies du bois, soit en continuité de l'historique (2003-2008), soit de création plus récente (2012-2015). Les données actuelles sont donc diverses selon les vignobles et les cépages.

Au total, un panel d'environ 700 parcelles (2014) ont été suivies. Les notations répondant aux critères définis par les protocoles harmonisés visent à déterminer le taux moyen de ceps présentant des symptômes foliaires, incluant les formes d'expressions lentes et sévères, ce qui correspond à la **prévalence** des maladies. L'esca - black dead arm, est prioritairement noté, l'eutypiose n'est observée que dans certains vignobles. Ces données se rapportent à une vingtaine de cépages et se déclinent sur la plupart des régions viticoles sans pour autant représenter exhaustivement l'ensemble des bassins de productions.

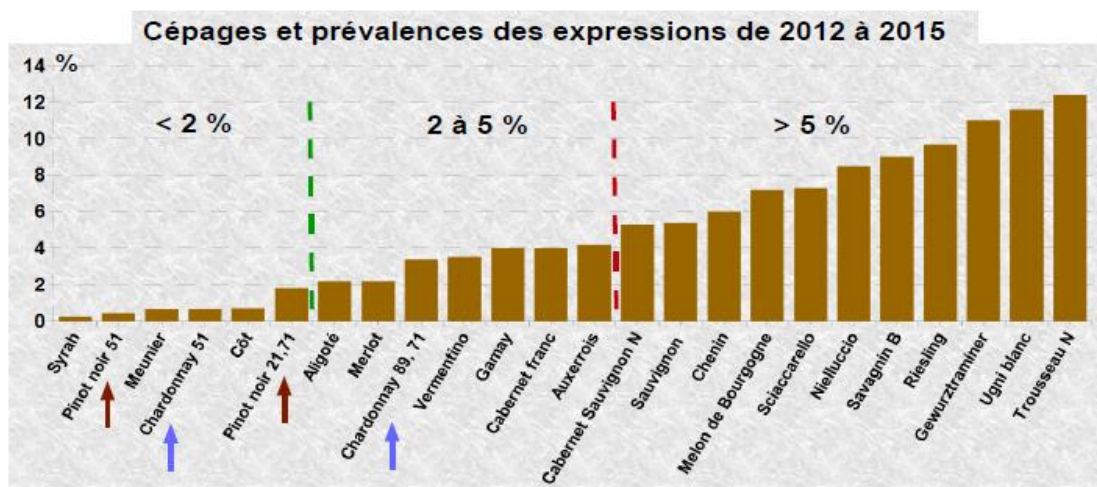
Les prévalences moyennes (fréquence de ceps atteints) sont calculées à partir de situations qui peuvent différer par le nombre de parcelles suivies pour chaque cépage. Les résultats montrent qu'au-delà des fortes variations inter-annuelles, les moyennes masquent aussi de fortes disparités entre parcelles et entre cépages y compris pour un même bassin viticole. Les résultats reflètent surtout des tendances en terme d'évolution globale.

Pour rappel, le niveau d'externalisation annuel des symptômes foliaires, pour l'esca sous formes lentes ou apoplectiques ou encore pour l'eutypiose est variable comme l'a démontré des suivis précis de ceps à ceps. En effet, le poids des facteurs abiotiques (conditions climatiques de l'année, en lien avec la disponibilité hydrique des sols, les techniques culturales) se conjugue avec ceux imputables aux facteurs biotiques. En d'autres termes, la seule approche annuelle serait réductrice pour évaluer l'état des lieux, la vision comparée et pluriannuelle s'inscrit davantage dans cet objectif.

L'**eutypiose** est suivie en Charentes, Val de Loire, Bourgogne, Beaujolais, Aquitaine. L'Ugni blanc en Charentes demeure de loin le cépage le plus atteint en 2015 sur l'observatoire avec une prévalence moyenne de 9 %. Dans une moindre mesure, le Cabernet Sauvignon, le Sauvignon dans le bordelais se situe vers 1 %, traduisant des expressions un peu plus marquées cette année pour la façade atlantique. Partout ailleurs, en Côtes du Rhône (Gamay en Beaujolais), en Bourgogne (Chardonnay, Aligoté,...), en Val de Loire, les prévalences moyennes sont inférieures à 1 %, ce qui s'inscrit dans la tendance de ces dernières années à savoir une moindre expression de l'eutypiose.

L'**esca/black dead arm** (les 2 syndromes ne sont pas différenciés dans la notation) constitue toujours la part la plus importante et préoccupante des maladies du bois, qu'il s'agisse de la forme lente ou foudroyante (apoplectique). Plus de la moitié des cépages observés sur la période 2012 à 2015 expriment des niveaux d'attaque proches ou supérieurs à

5 % (cf graphe).



En tendance, pour 2015, les niveaux d'expressions apparaissent plutôt contenus, voire en baisse perceptible dans la plupart des vignobles, hormis pour l'Alsace où l'observatoire reflète une progression pour le Gewurztraminer, le Riesling et l'Auxerrois. La moyenne atteint 9,3 % dont 0,9 % de ceps apoplectiques. En Charentes, l'Ugni Blanc demeure fortement impacté, avec 9,4 % dont 0,3 % de formes sévères. En Val de Loire, pour le Sauvignon, le Chenin, le Cabernet Franc et le Melon, les prévalences moyennes sont de 3,9 % dont 1,3 % de formes sévères.

La Champagne reste le vignoble le moins touché, avec 0,2 % de prévalence moyenne pour les 3 cépages Chardonnay, Pinot noir et Meunier. La Bourgogne, avec des cépages comparables mais diversifiés reflète des niveaux d'attaque assez stables de 1,6 % dont 0,9 % d'apoplexie. Dans le Beaujolais, le cépage Gamay présente également une expression moins marquée évaluée à 2,1 %. Le Jura, reflète la même tendance, la prévalence moyenne pour les 2 cépages Savagnin et Trousseau est de 5,7 % dont 3,3 % de forme foudroyante. Le Bordelais, présente également, pour le Cabernet Sauvignon, le Sauvignon, le Merlot et le Cabernet Franc, des expressions plus limitées. Le dispositif d'observation récent (2015) exprime en moyenne 1,2 % d'esca-bda dont 0,12 % d'apoplexie.

L'effet conjugué et dépendant des conditions climatiques, de la disponibilité hydrique des sols (généralement bien pourvue en sortie d'hiver, beaucoup plus contraignante en cours d'été), éléments à préciser suivant les régions, a certainement contribué à limiter en partie les expressions foliaires d'esca-bda.

L'impact agronomique des maladies du bois, peut se refléter par l'estimation de la surface improductive, correspondant à la somme des ceps morts, des absents, des complants, des recépés et des sévèrement touchés. La moyenne établie à partir de 7 régions se situe à hauteur de 13 % en 2015, très proche des valeurs de 2014 et 2013.

Bilan et perspectives :

Alors que la recherche demeure fortement mobilisée et active, les instances de gouvernance ont réaffirmé en 2015 la nécessité d'un plan d'action national et coordonné pour lutter contre les maladies du bois (rapport parlementaire de l'Assemblée nationale, séminaire dédié au dépérissement du vignoble, et très récemment, communiqué du ministre nommant une mission spécifique). Au-delà de l'objectif essentiel de tendre plus rapidement vers l'acquisition de solutions, l'importance des dispositifs d'observation est mise en avant. Cela se concrétisera par une relance et réorganisation de ces dispositifs.

Effet de l'esca sur la qualité des raisins et des vins

M. Jourdes^{a,b}, B. Lorrain^{a,b}, I. Ky^{a,b}, G. Pasquier^{a,b}, M. Fermaud^c, L. Guerrin Dubrana^c, L. Gény^{a,b}, P. Rey^c, B. Donèche^{a,b}, P.-L. Teissedre^{a,b}

^a Univ. Bordeaux, ISVV, EA 4577, Œnologie, 210 Chemin de Leysotte, F-33140 Villenave d'Ornon, France

^b INRA, ISVV, USC 1366 Œnologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France

^c UMR Santé Végétale 1065, ISVV – Centre INRA de Bordeaux, 71 av Edouard Bourlaux, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex, France

Contact : michael.jourdes@u-bordeaux.fr

L'esca est une maladie cryptogamique complexe répandue partout dans le monde et qui diminue de façon importante les rendements en France. La majeure partie des études liées à l'esca portent sur l'identification des champignons, leurs propagations et leurs métabolismes altérant les fonctions végétatives de la plante afin de trouver de nouveau moyen de lutte contre cette maladie. Cependant, très peu d'études ont portées sur l'effet de l'esca sur la composition chimique et phénolique de la baie de raisin et des vins issus de ceps ayant exprimés les symptômes de l'esca. L'objectif de cette étude était également de déterminer s'il y avait un pourcentage minimum de raisins issu de cep malade qui pouvait être toléré en vinification sans modifier la composition phénolique du vin et surtout ces propriétés sensorielles. Pour réaliser ces objectifs, des raisins sains et vins issus de ceps de Cabernet-Sauvignon ayant exprimés les symptômes de l'esca ont été récoltés à maturité. Par la suite des micro-vinifications avec des pourcentages croissant de raisins issus de cep malade ont été réalisées en 2009 (six vins contenant 0, 5, 25, 50, 75 et 100% de raisin malade) et en 2010 (quatre vins contenant 0, 5, 15 et 25% de raisin malade).

Il a été observé que les raisins issus de cep présentant les symptômes de l'esca présentent une maturité plus faible que les raisins sains avec notamment un taux de sucre plus faible (-10%) et une acidité plus forte (+ 20%). L'analyse des composés phénoliques totaux (phénol totaux, tanins totaux et anthocyanes totales) présent dans les parties solide de la baie (pépins et pellicules) ne révéla aucune différence majeure entre les raisins sains et les raisins issus de cep présentant les symptômes de l'esca. Néanmoins, une analyse plus spécifique des tanins par HPLC-UV-MS montre une diminution significative de la catéchine et de l'épicatéchine (de -15 à -45%) dans les pépins et les pellicules des raisins issus de cep malade ainsi qu'une diminution du degrés de polymérisation moyenne des tanins des pellicules. Une diminution très importante comprise entre -30 et -56% des anthocyanes a été observée dans les pellicules des raisins issus de cep malade par rapport à des raisins sains. Au vu des résultats obtenus sur deux millésimes consécutifs (2009 et 2010), il apparaît que la composition phénolique des pellicules est beaucoup plus modifiée par l'esca que la composition de pépins. Les analyses classiques (%éthanol, acidité totale, acidité volatile, pH) des vins obtenus durant nos micro-vinifications ne montrent pas de différence majeure, seule une augmentation significative d'acidité tartrique à partir de 15% de raisin malade ainsi qu'une diminution des anthocyanes et des tanins monomères et dimères a été observée à partir de même pourcentage. L'analyse sensorielle de ces vins, par un jury entraîné, a permis de souligner une discrimination significative des vins dès l'incorporation de 5% de raisins issus de cep présentant les symptômes de l'esca. Ces vins présentaient une importante diminution de leurs arômes fruités ainsi qu'une importante augmentation de leur caractère terreux et végétal/herbacé.

En conclusion, les raisins issus de cep présentant les symptômes de l'esca présentent un retard de maturité important. La composition phénolique de la pellicule est plus impactée que celle des pépins avec une réduction importante des anthocyanes et du degré de

polymérisation moyenne des tanins. Dès l'incorporation de 5% de raisins issus de cep malade, les propriétés sensorielles du vin sont altérées de façon significative.

Avancement modèle conceptuel sur les maladies du bois

Marion Claverie

Institut Français de la Vigne et du Vin, Pôle Rhône-Méditerranée, Institut Rhodanien, 2260, Route du Grès, 84100 Orange.

Contact : marion.claverie@vignevin.com

La modélisation conceptuelle est une méthode d'intégration de connaissances et de formulation d'hypothèses étayées en réponse à une problématique, généralement trop complexe pour être appréhendée simplement.

Les maladies du bois de la vigne totalisent une somme de connaissances et d'observations conséquentes mais de nombreuses questions et zones d'ombre subsistent. C'est dans ce contexte que la réalisation d'un modèle conceptuel a été proposée en 2013 lors de l'appel à projets CASDAR (retenue comme action du projet V1303), afin de constituer un outil permettant de faire ressortir les « trous de connaissance » ou servant de support à la réflexion pour cette maladie complexe et multi-factorielle.

Le principe du modèle a été de rassembler les connaissances éparses dans un schéma fonctionnel où les séquences d'événements s'enchaînent pour expliquer le passage d'un plant sain à un cep nécrosé, montrant les symptômes foliaires et enfin mort. Ces connaissances sont collectées à partir de la bibliographie scientifique et technique publiée, mais aussi de savoirs experts, grâce à une série d'entretiens en face à face. Les personnes interrogées sont les protagonistes des maladies du bois, mais aussi des agronomes compétents en matière de fonctionnement de la vigne. Ponctuellement des compétences non viticoles peuvent être sollicitées, comme cela a été le cas avec le domaine forestier. Des chercheurs internationaux ont également été interrogés sur le modèle, dans une version simplifiée. Au total une trentaine d'entretiens ont été réalisés couvrant le champ de la recherche et du terrain.

Le modèle, qui ne sera terminé qu'après la réunion de restitution aux experts permettant une dernière discussion des hypothèses conservées, détaille les principales étapes de contamination des plants, de la progression des champignons, discute le déclenchement des symptômes, leur fluctuation et le cas de l'apoplexie. Puis ce processus est replacé dans le contexte varié du fonctionnement d'un cep de vigne dans son environnement (climat, sol, pratiques culturales, microbiote, matériel végétal) afin de déterminer les principaux facteurs susceptibles d'accélérer ou ralentir son déroulement. Enfin, la démarche prévoit de reprendre les principales observations connues sur ce syndrome et de les confronter au modèle.

Ce modèle montre clairement l'importance de tous les protagonistes de la maladie, les champignons associés évidemment mais aussi la vigne elle-même. Il met l'accent sur la fonction de défenses de la vigne, processus en interaction directe avec les autres fonctions rencontrées sur une vigne « saine » (croissance, élaboration du rendement, remise en réserve) d'autant plus que les parties attaquées sont dans le cas présent, les parties pérennes du cep avec des pathogènes présents en permanence dans l'hôte. Enfin, le modèle offre un cadre pour raisonner et préciser l'impact des facteurs environnementaux fréquemment cités dans la littérature (climat, vigueur, taille, autres pratiques culturales...) en permettant de décomposer leur effet et d'identifier leurs cibles possibles.

En plus de son rôle d'outil d'aide à la réflexion, à la synthèse et au partage de connaissances sur les maladies du bois, le modèle conceptuel pourra aussi être utilisé pour proposer des itinéraires techniques permettant de limiter les symptômes au champ, en tenant compte de la diversité des situations viticoles régionales, et qu'il conviendra ensuite de tester.

Cette démarche permettra aussi de lister les questions fondamentales encore en suspens et constituant les plus gros freins à notre compréhension des mécanismes. Enfin, en matière de perspectives à ce travail, le modèle pourrait être le point de départ pour la conception de dispositifs expérimentaux permettant d'identifier les principales étapes et techniques culturales critiques sur la progression de la maladie au long de la vie du cep. Le modèle est actuellement qualitatif : pourrait-il devenir quantitatif ?

Partage d'observations de terrain et apport au modèle conceptuel

Marion Claverie

Institut Français de la Vigne et du Vin, Pôle Rhône-Méditerranée, Institut Rhodanien, 2260, Route du Grès, 84100 Orange

Contact : marion.claverie@vignevin.com

Un suivi a été initié en 2014 dans le cadre du projet France Agri Mer national Maladies du Bois visant à étudier les dernières années de vie des ceps atteints de maladies du bois et plus généralement l'impact des symptômes foliaires sur quelques indicateurs du fonctionnement du cep (récolte, vigueur). L'objectif est de vérifier dans quelle manière se fait sentir le « dépérissement » sur la production et la vitalité du cep. De telles observations visent aussi à mieux caractériser la rapidité et les modalités de survenue de la mort sur des ceps symptomatiques, surtout en termes de forme lente.

Pour cela, sur 3 parcelles situées dans le Vaucluse et les Bouches du Rhône, les symptômes sont suivis et repérés à l'échelle du courson (plus petite unité d'apparition des symptômes foliaires). Les symptômes sont notés à intervalles réguliers du début de leur extériorisation à la récolte. A chaque date est notée la forme et l'aspect du symptôme et son intensité. Ces mêmes coursions font ensuite l'objet d'autres notations de pesées de récolte, de bois de taille et une notation de pousse printanière pour vérifier si les réserves sont atteintes.

Les 2 années 2014 et 2015 de notations ont permis de mettre en évidence un certain nombre d'observations sur les symptômes foliaires

- L'unité pertinente pour les symptômes est le courson/baguette
- La sortie d'un symptôme sur un courson prend quelques jours à atteindre son intensité maximale, puis le symptôme « mature » (couleur et aspect évoluent) ;
- Un autre épisode peut ensuite toucher un autre courson du même cep à un autre moment de la saison (voire le même courson à nouveau parfois) ;
- Au bilan sur les 3 parcelles et les 2 années de suivi, 3 « épisodes » symptomatiques au maximum ont pu être identifiés (ponctuellement 4) pour un même cep ;
- Les intensités (=taux de feuillage symptomatique) de la forme lente sont très variable entre coursions ; pour la forme sévère, elles sont majoritairement totales (sur tout le courson) ;
- Le taux de mortalité d'un courson symptomatique l'année suivante est variable selon la forme du symptôme et selon la parcelle : le taux de mortalité de la forme sévère est très important (65 à 95% dans nos cas), moindre pour la forme lente laissant une grande place à l'effet parcelle et (à confirmer) millésime ; le plus souvent ce courson est déjà mort à la taille.

En termes d'atteinte à la vigueur et à la production, les résultats sont encore très préliminaires avec seulement une année de recul sur les 2 parcelles. Toutefois, les symptômes 2014 ont montré un effet significatif en 2015 à retarder la pousse printanière et un effet également dépréciatif de 30% sur le poids de récolte.

A titre d'illustration de cela, un travail d'évaluation des pertes de récolte due aux maladies du bois a été réalisé en 2014 sur l'une des parcelles pour laquelle le suivi des ceps symptomatiques était réalisé depuis 2010. En 2014, année à plutôt forte expression, et sur

cette parcelle de cabernet sauvignon présentant un niveau de maladies du bois très important, la perte de récolte a été estimée à -42% en 2014, ce nombre se décline en : -22% due à la mortalité de ceps entiers, plus 9% supplémentaires de mortalité de coursons et de pertes de vigueur plus 11% supplémentaires de pertes dues aux dégâts directs sur grappes des symptômes 2014.

L'ensemble de ces observations a été présenté en regard du travail explicatif réalisé avec le modèle conceptuel (voir intervention précédente). En effet, ces observations sont des manifestations de la maladie pour lesquelles le modèle doit être en mesure de proposer une hypothèse explicative. L'objectif de la présentation était de les partager avec la communauté technique. Il convient de poursuivre ces notations encore sur 1 à 2 campagnes.

Cycles biologiques des agents pathogènes

Philippe Larignon

IFV Pôle Rhône-Méditerranée, Domaine de Donadille, 30230 Rodilhan

Contact : philippe.larignon@vignevin.com

Les connaissances acquises durant ces quinze dernières années sur la vie des agents pathogènes permettent de définir le cycle biologique des champignons pathogènes.

Eutypa lata, responsable de l'eutypiose, est un champignon à dissémination aérienne qui se propage toute l'année. Il se conserve sous forme de périthèces. Les ascospores sont libérées deux heures après le début d'une pluie ; leur libération s'arrête 24 h, voire 36 h après la fin des précipitations. Elles pénètrent par les plaies de taille suite aux précipitations pendant la période hivernale et peuvent migrer jusqu'à 2 cm dans les tissus sous-jacents à la plaie. La sensibilité des plaies est élevée pour une taille précoce et faible pour une taille tardive. Lors de la période végétative, d'autres voies de contamination seraient possibles comme les plaies d'ébourgeonnage et d'épamprage. Il ne se propage pas par le matériel végétal de propagation. Des pycnides peuvent être parfois observés dans le vignoble ; le rôle des pycniospores n'est pas connu. Cependant, les études de variabilité génétique suggèrent qu'il se propage uniquement par sa forme sexuée.

Phaeomoniella chlamydospora, champignon associé à l'esca, se conserve sous forme de pycnides ou sous forme de mycélium à l'intérieur des crevasses fournissant un environnement favorable pour la sporulation. Il se dissémine toute l'année suite à une pluie. Il pénètre par les plaies de taille pendant la période hivernale ou les plaies en vert. La durée de sensibilité des plaies de taille est très longue. Ce champignon est détecté sur les lames du sécateur, mais aucune démonstration n'a été faite pour montrer que cela conduisait à une contamination *in natura*. Il a été considéré comme un champignon du sol (structures ressemblant à des chlamydospores, détection dans les sols, ...), mais aucune étude ne montre sa présence dans les racines de vigne âgées. Il se propage par le matériel végétal. En pépinières, il est détecté par PCR dans les bacs de réhydratation, sur les outils de greffage, les substrats utilisés pour la stratification. Deux phases lors de l'élaboration des plants ont été identifiées au cours desquelles ont lieu les contaminations : la stratification et l'élevage au champ. Les études de variabilité génétique suggèrent une propagation clonale.

Phaeoacremonium minimum, autre champignon associé à l'esca, se conserve sous forme de périthèces. Il se dissémine surtout pendant la période végétative en France suite à des pluies. En Californie, c'est plutôt pendant l'hiver et le printemps, même en absence de pluies. Il pénètre par les plaies de taille, et il a la potentialité de pénétrer les plaies occasionnées lors des opérations en vert. La durée de sensibilité des plaies est longue. Comme dans le cas de *P. chlamydospora*, il pourrait être propagé par les lames de sécateur ou par les arthropodes. Il a été détecté dans le sol ; même s'il a été montré qu'il était apte de contaminer via le système racinaire, l'importance de cette voie dans le vignoble n'est pas connue. Enfin, il se propage par le matériel végétal. En pépinières, il est détecté par PCR dans les bacs de réhydratation, sur les outils de greffage, les substrats utilisés pour la stratification. Une phase lors de l'élaboration au cours de laquelle a lieu des contaminations a été identifiée, il s'agit de l'élevage au champ. Les études de variabilité génétique suggèrent une propagation clonale notamment en France. Plusieurs génotypes peuvent être trouvés dans le vignoble suggérant aussi une reproduction sexuée.

Les *Botryosphaeriaceae*, associées à la Botryosphaeriose, sont des champignons plurivores. Il se conserve sous forme de pycnides trouvés sur d'anciennes plaies de taille, sur

le tronc, ou les sarments blanchis laissés au sol. La forme sexuée est rarement observée. Ils sont présents à la surface de différents organes de la vigne. La période de dissémination est variable selon les pays : automne (Chili), hiver (Afrique du sud, Californie, Chili). En France, elle a lieu toute l'année, mais plus particulièrement pendant la période végétative quand les températures moyennes sont supérieures à 9 – 10°C. Elle se réalise suite à des pluies ou par irrigation via des asperseurs. Il pénètre dans la plante par les plaies de taille ou encore par des blessures occasionnées lors des opérations en vert ou suite à des événements climatiques. Des tests de pathogénie réalisés dans le vignoble ont montré que la vigne est sensible lors de la période comprise entre la floraison et la véraison. Pour *Neofusicoccum parvum*, la sensibilité des plaies est élevée pour une taille précoce et faible pour une taille tardive ; les plaies fraîches sont plus sensibles. Pour *Diplodia seriata*, les plaies sont contaminées après la période des pleurs ; la durée de sensibilité est longue (au moins jusqu'à 4 mois). Il se propage par le matériel végétal. En pépinières, il est détecté par PCR dans les bacs de réhydratation, sur les outils de greffage, les substrats utilisés pour la stratification. Deux phases lors de l'élaboration des plants au cours desquelles ont lieu les contaminations ont été identifiées : la stratification et l'élevage au champ. Des études sont actuellement réalisées pour connaître l'origine de la présence des *Botryosphaeriaceae* dans les tissus ligneux des sarments et de leur surface. Il a été constaté que les rameaux sont surtout colonisés à partir de la véraison.

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce à la participation du CASDAR.

Les réseaux microbiens colonisant le bois de ceps de vigne atteint ou non par l'esca: stabilité et évolution temporelle

Emilie Bruez^{1,2}, Stéphane Compant³, Marc-Henri Lebrun⁴, Jessica Vallance^{1,2}, Angela Sessitsch³ et Patrice Rey^{1,2}

¹ Université de Bordeaux, Bordeaux Sciences Agro, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Gradignan, France.

² Institut National de la Recherche Agronomique, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, ISVV, Villenave d'Ornon, France.

³ Bioresources Unit, Health and Environment Department, AIT Austrian Institute of Technology GmbH, Tulln, Autriche.

⁴ Institut National de la Recherche Agronomique, UMR1290 Biologie Gestion des Risques en Agriculture, Versailles, France.

Contacts : emilie.bruez@bordeaux.inra.fr, patrice.rey@agro-bordeaux.fr

Les communautés fongiques et bactériennes présents dans les tissus ligneux du bois de ceps de vigne âgés de 10 ans ayant exprimé ou non les symptômes foliaires de l'esca ont été étudiées durant une année (4 prélèvements, un par saison). Pour cela des techniques complémentaires ont été utilisées : (i) le séquençage haut-débit (pyroséquençage) afin d'identifier les diverses communautés microbiennes, et (ii) une méthode de microscopie, la DOPE-FISH, qui permet de visualiser des communautés bactériennes à l'aide de sondes générales ou spécifiques, *i.e.* les Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Firmicutes dans le cas présent.

Les résultats du pyroséquençage ont montré que les communautés fongiques globales sont distinctes pour les 4 prélèvements. Néanmoins lorsque ces communautés sont analysées sous l'angle des réseaux, des espèces fongiques communes à tous les temps de prélèvements et d'autres, spécifiques à chacun d'eux, ont été mises en évidence. Pour les communautés bactériennes, deux groupes se distinguent : celui observés au printemps (avril) et en été (juin) et celui de l'automne (septembre) et de l'hiver (janvier). Les échantillons prélevés en juin et janvier ont été utilisés pour la DOPE-FISH et une forte colonisation des différents tissus du bois par ces bactéries a été observée. L'objectif à moyen terme sera de visualiser les interactions entre les bactéries et les champignons *in situ*.

Symptomatologie et étude de la microflore colonisant les ceps âgés du vignoble « Louis Pasteur »

David Renault^{1,2}, Christophe Bertsch³, Thierry Lacombe⁴, Pascal Lecomte^{1,2}, Barka Diarra^{1,2}, Michel Caboche⁵ et Patrice Rey^{1,2}

¹Institut National de la Recherche Agronomique, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE), ISVV, Villenave d'Ornon, France

²Bordeaux Sciences Agro, Université de Bordeaux, ISVV, UMR1065 SAVE, Villenave d'Ornon, France

³Laboratoire vigne biotechnologie et environnement EA 3391, Université de Haute-Alsace, Colmar, France

⁴INRA, UMR 1334 Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes (AGAP), équipe diversité et adaptation de la vigne et des espèces méditerranéennes, Montpellier, France

⁵Académie des Sciences, INRA, Route de Saint-Cyr, Versailles, France

Contacts : david.renault@bordeaux.inra.fr, patrice.rey@agro-bordeaux.fr

Le Clos de Rosières, vigne historique de Louis Pasteur, a récemment retrouvé son caractère expérimental de recherche pour devenir un site pilote d'étude des maladies du bois de la vigne.

Le premier objectif fut d'établir un état des lieux variétal et sanitaire précis de cette parcelle replantée il y a 70 ans. Le relevé ampélographique des 2057 ceps présents a révélé la présence de 4 cépages majoritaires (Chardonnay, Savagnin, Trousseau et Poulsard). Un cépage inconnu, nommé « cépage Pasteur », a également été découvert. Le relevé sanitaire de la parcelle a montré que le taux de symptômes foliaire d'esca était le plus élevé pour le Trousseau (2,8%) par rapport au Savagnin (1,4%) ou au Chardonnay (1,2%). Un nombre très important de ceps « manquants » (16,8%) caractérisait cette parcelle.

Le second objectif de cette étude fut de comparer les microflore bactériennes et fongiques colonisant le bois apparemment sain du tronc provenant de ceps (Chardonnay, Savagnin, Trousseau) ayant présenté ou non des symptômes foliaires d'esca durant 2 années consécutives (20 répétitions par modalité). Ces microflore ont été caractérisées *via* leurs empreintes moléculaires par analyse Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP).

L'analyse des communautés microbiennes du bois apparemment sain provenant de ceps asymptomatiques montre des microflore fongiques spécifiques à chacun des 3 cépages, le Chardonnay (moins sensible à l'esca) se distinguant très nettement du Trousseau et du Savagnin (plus sensibles). Le lien suggéré entre degré de sensibilité du cépage et type de communautés fongiques sera à approfondir lors de futures expérimentations. Au niveau des flores bactériennes, le Trousseau (le plus sensible) se distingue très nettement des autres cépages. L'hypothèse du rôle des communautés bactériennes comme facteur de sensibilité à l'esca devra être vérifiée.

La comparaison des communautés microbiennes provenant de ceps ayant présentés ou non des symptômes d'esca montre que, pour chaque cépage étudié, les ceps asymptomatiques ont un bois apparemment sain colonisé par des communautés bactériennes et fongiques distinctes de celles trouvées chez les ceps atteints d'esca. Ce résultat est très marqué chez le Trousseau. Ces résultats préliminaires tendent à montrer qu'avec le temps les communautés microbiennes se différencient selon les cépages et selon que les ceps ont exprimés ou non des symptômes foliaires d'esca.

Etude de la dynamique spatio temporelle de l'esca de la vigne à l'échelle de la parcelle

Shuxian Li^{1,2}, Anne Gégout-Petit³, Pierre Curmi⁴, Claire Grosjean⁵, Pauline Souquet,
Sylvie Bastien^{1,2} et Lucia Guérin-Dubrana^{1,2}

¹ INRA, ISVV, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE), F-33140 Villenave d'Ornon

² Université de Bordeaux, ISVV, UMR1065 SAVE, Bordeaux Sciences Agro, F-33140 Villenave d'Ornon

³ Université d'Avignon (Laboratoire de Mathématiques-EA2151), F-84914 Avignon, France

⁴ AgroSup Dijon, UMR Agroécologie, F- 21079 Dijon

⁵ Chambre Régional d'Agriculture de Bourgogne, F-21110 Bretenière

Contact : lucia.guerin@agro-bordeaux.fr

L'esca de la vigne représente une des maladies de dépérissement les plus préjudiciables, actuellement, pour l'ensemble du vignoble, en France et en Europe. Cette maladie est liée à la présence de champignons pathogènes se développant lentement dans les tissus ligneux. Son développement est également conditionné à l'environnement pédoclimatique et aux facteurs culturels. L'étude de la dynamique spatiale et temporelle à l'échelle de la parcelle de vigne permet de s'affranchir de certaines sources de variabilité, tels que le cépage, l'âge et les pratiques culturales. Des analyses utilisant des tests statistiques non paramétriques sont réalisées à partir de données de 15 parcelles de la région de Bordeaux, collectées entre 2004 et 2011, pour répondre aux questions suivantes : Comment la maladie est distribuée dans la parcelle et comment cette distribution évolue-t-elle au cours du temps ? Les ceps symptomatiques permettent-ils une contagion de proche en proche ? Est-ce que cette contagion est dirigée le long des rangs ? Les résultats montrent que la prévalence de l'esca et sa dynamique temporelle sont très variables selon les parcelles. La structure spatiale varie également beaucoup entre les parcelles et n'est pas reliée au niveau de prévalence de l'esca. Quatre parcelles révèlent une structure agrégative complexe quand d'autres ne montrent que de petits clusters de 2 à 3 ceps orientés selon le rang ou non. L'étude montre peu de dépendance spatiale entre ceps ayant exprimé des symptômes d'esca et les nouveaux cas suggérant pas ou peu de contagion à petites distances à partir des ceps symptomatiques. L'origine de l'agrégation dans quelques parcelles peut être reliée aux facteurs d'hétérogénéité intra parcellaire tels que les facteurs pédologiques. Tester cette hypothèse demande à caractériser cette hétérogénéité pour obtenir une information spatialisée à l'échelle du cep pouvant être reliée aux données de maladie.

Rôle de la conduite sur le développement des maladies du bois de la vigne

Pascal Lecomte¹, Barka Diarra¹ et Christel Chevrier²

avec le concours de : ^{1,3}E. Bruez, ^{3,1}L. Guerin-Dubrana, ³S. Bastien, ¹S. Gambier, ¹V. Mayet-Cook, ^{1,3}D. Renault, ^{3,1}P. Rey, ^{3,1}J. Vallance, P. Malhomme (Terres de Gascogne), N. Bals (CA34), G. Delorme (CDA39), J. Dureuil (CA71), C. Grosjean (CRAB), R. Travadon et K. Baumgartner (Univ. Davis), H. Ojeda, M. Heywang, E. Zumstein et J.-L. Escudier (INRA Pech-Rouge)

¹ INRA, ISVV, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE), F-33140 Villenave d'Ornon

² CRA Languedoc-Roussillon, Maison des Agriculteurs, Mas de Saporta CS 30012, F-34970 Lattes

³ Université de Bordeaux, ISVV, UMR1065 Save, Bordeaux Sciences Agro, F-33140 Villenave d'Ornon

Contact : pascal.lecomte@bordeaux.inra.fr

Ce texte présente les premiers résultats obtenus après 2 années de travaux réalisés dans le cadre de l'action 2 du programme CASDAR/CNIV V1303 intitulé «Evaluer l'impact de techniques agricoles et des facteurs environnementaux pour prévoir et lutter contre les maladies du bois de la vigne». Ce programme, initié en 2014, est piloté par C. Chevrier et s'achèvera en 2016. Cette action 2 se divise en deux études, l'une descriptive et l'autre plus analytique, dans le but de mettre en évidence le rôle de la conduite ou de la taille sur le développement de l'esca. Pour la première étude, plusieurs couples de parcelle présentant des profils agronomiques assez comparables (cépage, PG, année de plantation et environnement, esca majoritaire) mais présentant des modes de conduite ou de taille très différents ont été suivis en Gironde, dans le Gers, le Jura et près de Montpellier. Les symptômes (sur feuilles et au niveau du bois) imputables aux maladies du bois (esca) ont été notés en fin de saison (septembre et début octobre). Seule la variable « ceps improductifs » (cumul des ceps morts, manquants, replantés, restaurés ou présentant une partie de bois mort) a été exploitée. Les % de ceps improductifs ont été comparés par des tests khi² ou des analyses de variance. Voici quelques exemples de résultats. Dans le Gers, la comparaison de deux parcelles proches de Colombard, a montré que celle conduite en Guyot avec deux bras bien formés est 3 fois moins atteinte (13.6%) que celle conduite en Guyot simple sans véritable bras (40.3%). En Gironde, à Castillon, la comparaison de deux parcelles voisines de 50m, avec des cépages de sensibilité proche (C. Franc et C. Sauvignon), a montré que celle conduite en Guyot double avec des bras longs et bien taillée en respectant plusieurs des principes de taille énoncés par Mr Poussard (Lafon, 1921) est 7 fois moins impactée par l'esca (9.9%) que celle conduite en Guyot simple avec des bras très courts ou inexistant (66.4%). Toujours en Gironde, à Saint Genis-du-Bois, une parcelle de Merlot, avec un dispositif expérimental, certes ancien mais rigoureux, mis en place par Alain Carbonneau dans les années 80 et comparant deux modes de conduite, la lyre et le guyot, montre que les ceps conduits en guyot sont au moins 3 fois plus impactés par l'esca (32.5%) que ceux conduits en cordon/lyre (9.8%). Dans un domaine de l'Hérault, quelques parcelles du cépage Sauvignon Blanc initialement conduites en guyot ont été reconverties en non taille depuis 2009. Des différences à l'avantage des parcelles en non taille s'observent déjà (23.8% contre 35%). Dans le Jura, la comparaison de deux parcelles en guyot simple de cépage Chardonnay, contigües, l'une jugée bien taillée avec deux appels de sève et l'autre jugée moins bien taillée avec un seul appel de sève sur le côté des troncs, montre que cette dernière (plus âgée) est 2 fois plus impactée (34.4% contre 15.6%). L'approche analytique s'inscrit dans un projet franco-américain et a permis de caractériser par des variables mesurées un effet mode de conduite et de taille en comparant des ceps conduits en taille minimale avec des ceps conduits en cordon sur le site INRA de Pech-Rouge. Deux

cépages ont été comparés et trois critères ont été examinés: l'importance des nécroses internes et l'abondance et la composition du microbiote. L'esca a été noté en 2013 et les ceps ont été prélevés la même année. Les résultats ont montré que le Mourvèdre, avec 22% de ceps symptomatiques (sur feuilles et bois), était moins affecté que la Syrah (31%) et que la conduite en taille minimale présentait moins de ceps altérés (14.3% contre 39.2%), tendance confirmée très significativement en termes de surface de nécroses (19.9% de surfaces nécrosées pour la taille minimale contre 35.5% pour le cordon et 19.4% pour le Mourvèdre contre 36% pour la Syrah). Les analyses en laboratoire ont montré que les pathogènes sont présents partout dans le bois des deux cépages et des deux types de forme, néanmoins, les analyses moléculaires ont montré une interaction cépage-conduite avec un profil distinct des autres dans le cas de l'association Syrah-Cordon, et également une interaction conduite/type de bois examiné, les ceps en cordons montrant un profil différent au niveau des nécroses centrales. Ces résultats sont appuyés par les identifications moléculaires à partir des colonies isolées montrant dans ces nécroses centrales une abondance relative des champignons pathogènes du genre *Diaporthe*, de l'espèce *Neofusicoccum parvum* et de *P. chlamydospora*. L'ensemble des résultats permettent de conclure que, quelle que soit la démarche, exploratoire ou analytique, la tendance est la même: il y a un net effet du mode de conduite et de taille sur le développement de l'esca.

Impact du porte- greffe sur l'expression des symptômes foliaires de l'esca

Coralie Laveau¹, Séverine Mary¹ et Jean-Philippe Roby²

¹ Vitinnov, 1 cours du Général de Gaulle, 33170 Gradignan

² Bordeaux Sciences Agro, 1 cours du Général de Gaulle, 33170 Gradignan

Contact : coralie.laveau@agro-bordeaux.fr

L'esca et le Black Dead Arm (BDA) sont des maladies de dépérissement de la vigne complexes et encore mal comprises. Plusieurs facteurs ont été identifiés comme pouvant potentiellement avoir un impact sur l'expression foliaire de ces maladies. Parmi eux les facteurs de prédispositions tels que l'âge, le cépage, le porte-greffe ou les modes de conduite sont des facteurs sur lesquels les viticulteurs peuvent agir.

Suite à des demandes récurrentes des viticulteurs sur l'effet des porte-greffes sur l'expression foliaire de l'esca, l'étude de ce facteur a retenu notre attention parmi les différents facteurs possibles. Dans le Bordelais, deux parcelles de Cabernet-Sauvignon plantées avec plusieurs porte-greffes ont été trouvées. La première comporte 12 répétitions de 4 porte-greffes à savoir Riparia Gloire de Montpellier (RGM) 101-14 Millardet et de Grasset (101-14 Mgt), 3309 Couderc (3309 C) et Gravesac soit 3120 ceps par porte-greffe. Trois de ces porte-greffes sont également présents sur la seconde parcelle à savoir Riparia Gloire de Montpellier, 101-14 Millardet-Grasset, Gravesac auxquels s'ajoutent le 420 A avec 4 répétitions pour chacun soit 1236 ceps par porte-greffe. Les symptômes foliaires d'esca et de BDA que ce soit les formes lentes ou les formes apoplectiques ont été notés depuis 2010 tandis que les ceps « improductifs », les ceps manquants, morts ou complantés, sont dénombrés depuis 2013.

Sur la période considérée, le taux moyen d'esca/BDA et d'improductifs est respectivement est de 8,5% et 13,7% sur la première parcelle tandis qu'ils sont de 3,1% et 6,8% sur la seconde. 2010 et 2011 sont des années de faible expression foliaire tandis que 2012 et 2014 sont des années de forte expression foliaire avec un taux supérieur à 12,5% sur la première parcelle et à 4% sur la deuxième. On observe donc de grandes variations interparcellaires et interannuelles.

Au niveau des porte-greffes, le RGM manifeste significativement moins de symptômes foliaires quelle que soit l'année considérée. Par contre le porte-greffe qui manifeste le plus de symptômes est différent selon les années. Il s'agit du Gravesac les années de faible expression et du 101-14 Mgt les années de forte expression. Au contraire, sur la seconde parcelle, des différences significatives n'ont été observées qu'en 2014 : le 101-14 Mgt présentait significativement moins de symptômes foliaires que les 3 autres porte-greffes au cours de cette année pourtant favorable à l'extériorisation des symptômes en Bordelais.

Des différences d'expression foliaires de l'esca/BDA ont donc été observées mais les porte-greffes conférant le moins ou le plus de symptômes varient d'une parcelle à l'autre voire d'une année à l'autre. Il semble donc que le rôle du porte-greffe dans l'extériorisation des symptômes nécessite une étude plus approfondie. D'ores et déjà des mesures ont été réalisées en 2015 sur la première parcelle afin de caractériser précisément la vigueur, le statut hydrique et le statut azoté de chacune des répétitions de chaque porte-greffe.

Impact du type de greffe sur l'expression des symptômes foliaires de l'esca

Séverine Mary¹, Marc Bireben², Coralie Laveau¹ et Jean-Philippe Roby³

¹ Vitinnov, 1 cours du Général de Gaulle, 33170 Gradignan

² Worldwide Vineyards, BP16 - Valmoussine, 83660 Carnoules

³ Bordeaux Sciences Agro, 1 cours du Général de Gaulle, 33170 Gradignan

Contact : coralie.laveau@agro-bordeaux.fr

L'esca et le Black Dead Arm (BDA) sont des maladies de dépérissement de la vigne complexes et encore mal comprises. Dans ce contexte, de nombreuses questions sur les pratiques à mettre en œuvre au vignoble pour gérer les impacts de ces maladies et préserver les ceps ont vu le jour. L'étude est issue d'une collaboration entre la société de greffage Worldwide Vineyard et la cellule de transfert Vitinnov. Elle vise à mesurer l'impact du type de greffe sur l'expression foliaire des symptômes d'esca et de BDA.

Trois types de greffe ont été comparés : la greffe manuelle ou en fente pleine, la greffe à l'anglaise ou semi-mécanique, et la greffe oméga ou mécanique qui représente aujourd'hui 95% des opérations de greffage.

Afin d'étudier l'impact du type de greffe, un réseau de 49 parcelles a été suivi pendant 2 ans (2013-2014) dans 2 régions viticoles dans lesquelles un cépage sensible a été choisi: le Mourvèdre en Provence et le Cabernet-Sauvignon en Bordelais. La qualité du matériel végétal et de la plantation, le mode de conduite, le système de taille sont autant de facteurs qui peuvent avoir un impact sur les symptômes de l'esca/BDA. Afin de limiter au mieux ces facteurs, le choix de couple de parcelles appartenant au même exploitant a été fait. L'âge des parcelles est également un facteur important dans l'expression des symptômes de l'esca et du BDA car les taux d'expression fluctuent en fonction de l'âge des parcelles et sont maximaux entre 12 et 18 ans. Ce facteur « âge » a été cependant difficile à prendre en compte car les types de greffe retenus ont été pratiqués à des périodes différentes qui ne se chevauchent pas forcément dans le temps. Finalement, les âges des parcelles greffées manuellement et de façon semi-mécanique sont comparables. Par contre, toutes les parcelles greffées mécaniquement sont plus récentes du fait de l'arrivée de cette technique de greffe qui a très majoritairement remplacée les autres.

Cette étude a permis de mettre en évidence qu'il y a significativement moins de symptômes d'esca/BDA pour les parcelles greffées en fente pleine que pour les 2 autres types de greffes (anglaise et oméga), pour les 2 cépages étudiés et pour les 2 années de suivi (2013 et 2014). L'âge des parcelles greffées manuellement et semi-mécaniquement étant bien comparable, notre réseau met bien en évidence qu'il y a significativement plus d'esca/BDA sur les parcelles greffées à l'anglaise. Par contre, il ne permet pas de conclure de façon définitive pour la greffe oméga même si les taux d'Esca sur les parcelles greffées en Oméga est également significativement supérieur à celles greffées sur place en fente pleine.

La principale hypothèse pouvant expliquer ces résultats est la plus grande surface de contact entre les cambiums entre le porte-greffe et le greffon qui garantirait une soudure donc une greffe de meilleure qualité. Le greffage sur place permettrait également à la plante d'allouer plus de ressources à la formation d'un cal de qualité et une meilleure circulation de la sève entre le greffon et le porte-greffe. Ces premiers résultats sont encourageants et justifient la mise en place d'un dispositif expérimental pour étudier les types de greffes dans des conditions similaires d'âge et de conditions environnementales.

Caractérisation des *Botryosphaeriaceae* associés aux maladies du bois de la vigne

Gwenaëlle Comont¹, Anthony Bellée¹, Aurélia Nivault¹ et Marie-France Corio-Costet¹

¹ INRA, ISVV, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, CS 20032 - 33882 Villenave d'Ormon, France

Contacts : gwenaelle.comont@bordeaux.inra.fr, coriocos@bordeaux.inra.fr

Les maladies du bois de la vigne, depuis une décennie, sont devenues très préoccupantes pour les viticulteurs dans le monde. Ces maladies complexes sont sans doute liées à de nombreux facteurs biotiques ou abiotiques. De plus, l'impact de ses maladies peut être très différent selon les vignobles, voire selon les parcelles considérées. Parmi les agents pathogènes impliqués dans ces dépérissements, 13 espèces de la famille *Botryosphaeriaceae* sont décrites sur vigne. Ces espèces appartiennent à plusieurs genres différents et sont caractérisées par des agressivités très variées *in vitro* ou *in planta*. Cependant, peu de données existent sur la répartition de ces différentes espèces de champignons dans le vignoble français, ou de manière plus fine sur leur distribution au niveau d'une plante. L'objectif de cette étude était donc d'évaluer la diversité et la distribution des espèces de *Botryosphaeriaceae* présentes dans le vignoble français et d'étudier la répartition de cette famille de champignons sur des plantes symptomatiques ou non. Pour cette étude, des plants exprimant ou non des symptômes foliaires provenant de 21 parcelles issues de 7 régions viticoles françaises ont été échantillonnés. Les 700 isolats de *Botryosphaeriaceae* issus de cette campagne de prélèvements ont été identifiés morphologiquement et génétiquement sur la base du domaine 5' terminal du gène de la grande sous-unité ribosomique (28S). Pour certaines souches représentatives, cette identification a été complétée par l'amplification de la zone inter génique ITS1-ITS2, et par une séquence du gène de la β -tubuline. Sept espèces de *Botryosphaeriaceae* ont ainsi été identifiées dans différents vignobles français : *Botryosphaeria dothidea*, *Spencermartinsia viticola*, *Neofusicoccum parvum*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Diplodia mutila*, *Diplodia sapinea* et *Diplodia seriata*. L'espèce *Diplodia seriata* est l'espèce très majoritairement (plus de 85 % de la diversité) isolée dans le vignoble sur des plantes saines ou ayant présentés des symptômes. Afin de caractériser les espèces isolées, des tests d'agressivité *in vitro* et *in planta* ont été réalisés. Les tests de croissance *in vitro* montrent une grande diversité de la vitesse de croissance en fonction des espèces. Cependant, les souches appartenant aux mêmes espèces se regroupent dans les mêmes groupes statistiques. De même, une grande diversité dans la taille des nécroses est observée dans les tests *in planta*. Enfin, il existe une corrélation pour les résultats obtenus par ces deux tests d'agressivité, les souches provoquant les plus grosses nécroses sur plante sont aussi les souches avec la croissance la plus rapide à 28°C.

Phytotoxines de *Neofusicoccum parvum*
(CASDAR V12301 - Action 1 - Sous-Action 1)

Eliane Abou-Mansour

Université de Fribourg, Département de Biologie - Plant Biologie, 3 rue Albert Gockel, CH-1 700 Fribourg, Suisse.

Contact : eliane.abou-mansour@unifr.ch

Les plantes ainsi que les champignons produisent en abondance des substances naturelles appelées métabolites secondaires. La polyvalence des rôles des métabolites secondaires apparaît essentielle dans de nombreux phénomènes biologiques dans l'interaction plante-pathogène. Ces interactions complexes mettent en œuvre de nombreuses voies de communications chimiques. La compréhension du dialogue chimique entre la plante et le pathogène nécessite l'identification des signaux chimiques engendrés, d'une part par le champignon pour son attaque, et d'autre part par la plante pour sa défense. En particulier, de nombreux champignons endophytes habituellement inoffensifs peuvent, une fois la plante hôte affaiblie ou stressée, modifier leur cycle de vie et devenir saprophytes ou pathogènes. Dans ce dernier cas, ils produisent des phytotoxines nécessaires à leur virulence.

A partir *Neofusicoccum parvum* et *Diplodia seriata* responsable de la botryosphaeriose, plusieurs composés à activités phytotoxiques ont été identifiés, comme les dihydroisocoumarines (*R*)-melleine et ses dérivées hydroxylés. Alors qu'à partir de *N. parvum* des composés appartenant aux epoxytoluquinols, (+)-terremutin, (+)-terremutin hydrate, (+)-epi-sphaeropsidone, (+)-4-chloro-terremutin hydrate, et (+)-4-hydroxysuccinate-terremutin hydrate, ainsi qu'aux epoxylactones, (6*S*,7*R*) asperlin et (6*R*,7*S*)-dia-asperlin, ont été identifiés. Le rôle des phytotoxines isolées dans les interactions plante-pathogène sont présentés.

A plus long terme, l'élucidation des cibles moléculaires chez la plante permettront d'élaborer des traitements novateurs pour l'agronomie plus durables et plus respectueux de l'environnement.

Pathogénie des composés extracellulaires de deux champignons impliqués dans les maladies du bois de la vigne

Mélanie Gellon¹, Flore Mazet¹, Mary-Lorène Goddard², Céline Tarnus², Christophe Bertsch¹ et Sybille Farine¹

¹Laboratoire Vigne, Biotechnologies et Environnement - EA 3991 - UHA - 33 rue de Herrlisheim, 68000 Colmar – France.

²Laboratoire de Chimie Organique et Bioorganique, École Nationale Supérieure de Chimie - UHA, 3, rue Alfred Werner - 68093 Mulhouse - France.

Contacts : sibylle.farine@uha.fr

Parmi les différentes préoccupations des professionnels, les maladies du bois de la vigne (principalement eutypiose, esca et Black Dead Arm) sont la priorité absolue de la filière depuis l'interdiction en 2001 de la seule molécule efficace, l'arsénite de sodium.

Ces maladies sont associées à la présence de différents champignons capables de dégrader les tissus ligneux (1). Présents dans le tronc, ces champignons ne sont pas retrouvés au niveau des feuilles et des baies bien que ces dernières expriment des symptômes caractéristiques. L'hypothèse de molécules sécrétées par les champignons agissant à distance a donc été émise (2, 3).

Afin de pouvoir répondre à cette hypothèse, nous avons initié une étude de la caractérisation de l'interaction vigne – agents pathogènes.

Pour cela nous avons testé la phytotoxicité de composés extracellulaires de deux champignons de la famille des *Botryosphaeriaceae* (*N. parvum* et *D. seriata*) sur le modèle cals de *V. vinifera* cv Chardonnay.

Ces travaux nous ont permis de mettre en évidence une différence de production de métabolites secondaires tant d'un point de vue quantitatif que qualitatif entre les deux champignons étudiés. Nous avons montré que les surnageants de culture ainsi que les protéines extracellulaires totales produites par *N. parvum* induisent davantage de nécroses et d'expression des gènes de défense sur les cals de Chardonnay que celles de *D. seriata*.

Nous avons pu observer que la toxicité des surnageants totaux de cultures des deux champignons étudiés est supérieure à celle des protéines extracellulaires, elle-même supérieure à celle de la melléine, une toxine caractéristique des *Botryosphaeriaceae* (4, 5). Il semblerait donc très probable qu'une action conjointe entre les protéines extracellulaires et les autres métabolites secondaires (comme les toxines ou les polysaccharides) soient impliquées dans la phytotoxicité des *Botryosphaeriaceae*.

Nous avons réalisé une séparation des protéines extracellulaires par chromatographie anionique. Les tests de phytotoxicité des différentes fractions protéiques obtenues devraient nous permettre de sélectionner la ou les fraction(s) d'intérêt afin de nous focaliser sur ces dernières pour isoler, puis identifier la ou les protéine(s) impliquée(s) dans la toxicité de *N. parvum*.

(1) Bertsch et al. 2013 - *Plant Pathology*, 62:243-389 265 ; (2) Mugnai et al. 1999 - *Plant Diseases*, 83:404-418 ; (3) Andolfi et al. 2011 - *Toxins*, 3:1569-1605 ; (4) Ramirez-Suero et al. 2014 – *Protoplasma*, 251:1417-1426 ; (5) Bénard-Gellon et al. 2015 – *Protoplasma*, 252:679-687.

Réactions de défenses induites par les composés extracellulaires des *Botryosphaeriaceae* sur des cultures cellulaires de *Vitis*

Elodie Stempien, Mélanie Bénard-Gellon, Hélène Laloue, Sybille Farine, Flore Mazet-Kieffer, Christophe Bertsch et Julie Chong

Université de Haute-Alsace, Laboratoire Vigne Biotechnologie et Environnement, EA 3991 - UHA - 33 rue de Herrlisheim, 68000 Colmar – France.

Contacts : elodie.stempien@gmail.com,

Les maladies du bois de la vigne sont dévastatrices pour la pérennité du patrimoine viticole. On distingue trois principales maladies du bois : l'esca, le botryosphaeria dieback et l'eutypiose. Ces maladies, qui impliquent des complexes de champignons, s'attaquent aux organes de la vigne provoquant à plus ou moins long terme la mort du cep [1]. Étant donné que les champignons impliqués dans les maladies du bois ont seulement été isolés dans le bois mais jamais à partir de feuilles symptomatiques, il a été émis l'hypothèse que les symptômes visibles sur les feuilles et les baies résultent de la migration de toxines produites par des champignons depuis le bois. De récentes études de toxicité des composés extracellulaires totaux ainsi que des protéines produits par les deux principaux champignons associés au botryosphaeria dieback montrent que ceux-ci induisent des nécroses ainsi que l'expression de gènes de défense [2,3].

La résistance des plantes aux agents pathogènes dépend de la capacité à mettre en place rapidement et efficacement les réactions de défense. Dans ce contexte, nous nous sommes donc intéressés aux réactions de défense induites dans des cellules de vigne de deux génotypes différents (*Vitis vinifera* L. cv *Gewurztraminer* et *Vitis rupestris*) par les composés et protéines extracellulaires des *Botryosphaeriaceae*. Pour ce faire nous avons utilisé un modèle simplifié, des suspensions cellulaires, pour étudier les flux d'ions (à travers l'alcalinisation du milieu extracellulaire) qui conduisent à la production de phytohormones et de phytoalexines puis à l'expression des gènes de défense ainsi qu'à la mort cellulaire programmée.

L'ajout des composés ou des protéines extracellulaires induit une alcalinisation rapide du milieu de culture des cellules de vigne, de différente intensité en fonction du champignon mais avec une tendance similaire entre les deux types de composés. Cette alcalinisation est cependant deux fois plus intense pour le cépage *Vitis rupestris*. Nous avons alors émis l'hypothèse qu'il serait peut-être le génotype le plus résistant des deux. En comparant les différents champignons, nous avons constaté que lors des événements précoces (alcalinisation du milieu), les *Neofusicoccum parvum* induisent plus intensément les réponses de défenses que *Diplodia seriata*. Mais par la suite, pour les réponses de défenses dites « tardives », le phénomène s'inverse. Une inhibition d'une étape de signalisation de la défense de la plante par des effecteurs de nature protéique pourrait expliquer la virulence des *Neofusicoccum parvum* et une meilleure résistance de la plante face à *Diplodia seriata* pourrait expliquer sa plus faible agressivité.

[1] Bertsch C *et al.*, (2013) Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology* 62:243-265.

[2] M. Ramírez-Suero *et al.*, (2014) Extracellular compounds produced by fungi associated with Botryosphaeria dieback induce differential defense gene expression patterns and necrosis in *Vitis vinifera* cv. Chardonnay cells. *Protoplasma* 251:1417-1426

[3] M. Benard-Gellon *et al.*, (2015) Toxicity of extracellular proteins from *Diplodia seriata* and *Neofusicoccum parvum* involved in grapevine botryosphaeria dieback. *Protoplasma* 252:679-687.

Processus de détoxification mis en place par *Vitis vinifera* contre les phytotoxines fongiques d'origine phénoliques (CASDAR V1301 - Action 1 - Sous-Action 2)

**Patricia Trotel-Aziz¹, A. Aziz¹, B. Courteaux¹, Maryline Magnin-Robert¹, JF. Guise¹,
Christophe Clément¹, Florence Fontaine¹ et Eliane Abou-Mansour²**

¹SFR Condorcet, URCA, URVVC-EA 4707, BP 1039, 51 687 Reims Cedex 2.

²Université de Fribourg, Département de Biologie - Plant Biologie, 3 rue Albert Gockel, CH-1 700 Fribourg, Suisse

Contact : patricia.trotel-aziz@univ-reims.fr

Dans le cas des maladies du bois, l'expression des symptômes au niveau des feuilles et des baies n'est pas reliée à la présence des *Botryosphaeriaceae* dans ces organes, mais à la présence de divers métabolites secondaires très agressifs envers la vigne, dont ceux d'origine phénolique. L'implication de ces phytotoxines phénoliques d'origine fongique dans l'initiation et/ou l'intensité des symptômes du Black Dead Arm (BDA) chez la vigne est fortement suspectée, bien qu'à ce jour aucune relation entre la pathogénie et la toxicité de ces molécules n'a été mise en évidence. L'origine naturelle de ces phytotoxines leur permet *a priori* d'être facilement reconnaissables par les enzymes de détoxification des plantes, ce qui pose question quant à l'efficacité des mécanismes de détoxification de la vigne pour prévenir l'accumulation de ces molécules dans les feuilles et les baies des ceps présents au vignoble, voire même pour prévenir tout ou partie des symptômes du BDA chez la vigne -sous réserve de l'importance de la contribution de ces phytotoxines à l'agressivité des pathogènes concernés. Il est donc proposé d'évaluer la capacité de détoxification d'une vigne saine au moyen d'un modèle simplifié exposé à deux phytotoxines distinctes très agressives : la terrémutine et la melléine.

La non-toxicité des concentrations en phytotoxines a d'abord été vérifiée avant d'aborder l'étude de détoxification. Les résultats obtenus soulignent la capacité des vitroplants de vigne à éliminer rapidement la melléine ou la terrémutine présente dans leur milieu de culture. En 48h, cette disparition est quasi-totale pour la melléine, retrouvée en l'état dans les racines des vitroplants, et dépasse les 60% pour la terrémutine. L'optimisation de la capacité de détoxification des vitroplants à l'aide de bactéries bénéfiques issues du vignoble montre que les vitroplants bactérisés avec *Bacillus subtilis* PTA-271 sont tout autant capables d'éliminer rapidement la melléine de leur milieu, en réduisant le stockage en l'état de la melléine dans les racines des vitroplants (disparition nette de melléine supérieure à 50%). Compte-tenu de la capacité propre de *B. subtilis* PTA-271 à éliminer directement les phytotoxines de son milieu après un certain temps de latence, l'optimisation de la capacité de détoxification des vitroplants bactérisés pourra encore être renforcée, avant d'identifier les métabolites de phytotoxines éventuellement formés, puis de caractériser les mécanismes de détoxification mis en œuvre et d'appréhender leur mode de régulation.

L'objectif ultime étant d'optimiser la capacité de détoxification de la vigne afin de la rendre plus tolérante au BDA, des tests de protection sont parallèlement réalisés pour rendre compte du gain potentiel de protection sous conditions optimisées. Les tests préliminaires sur boutures bactérisées confirment déjà le potentiel de *B. subtilis* PTA-271 à protéger les boutures de vigne contre *N. parvum* Bourgogne. Quelle que soit la nature des interactions engendrées, l'association plante-bactérie apparaît donc bénéfique tant pour diminuer la teneur en melléine en l'état dans les vitroplants que pour protéger les boutures de vigne contre *N. parvum* Bourgogne.

Mise au point d'une technique d'hybridation *in situ* visant la co-localisation *in planta* des *Botryosphaeriaceae* et de marqueurs de défense

Antonin Douillet¹, Lucile Jacquens², Marielle Adrian², Florence Fontaine³, Philippe Larignon¹ et Sophie Trouvelot²

¹ Institut Français de la Vigne et du Vin, 7 avenue Cazeaux, 30230 Rodilhan, France.

² Université de Bourgogne, UMR 1347 Agroécologie, ERL CNRS 6300, BP 86510, 21000 Dijon, France.

³ Université de Reims, Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne, URVVC EA 4707, 51097 Reims Cedex, France

Contacts : sophie.trouvelot@u-bourgogne.fr, philippe.larignon@vignevin.com

Lors d'études précédentes, l'IFV a caractérisé la diversité d'espèces fongiques impliquées dans la botryosphaeriose (BDA), révélant notamment l'implication de deux espèces majeures : *Diplodia seriata* et *Neofusicoccum parvum*. Si ces populations sont désormais identifiables (par des techniques moléculaires) au vignoble et que leurs caractéristiques phytopathogéniques (origine des contaminations, période de sensibilité de la plante, etc...) à la parcelle se précisent, aucune localisation *in planta* n'a encore été réalisée en conditions naturelles (c'est-à-dire au sein d'un complexe fongique). En effet, si des études cytologiques (microscopie électronique) ont décrit, en conditions contrôlées, les phases de développement de ces champignons au contact des cellules végétales (Amponsah *et al.*, 2012), il apparaît désormais indispensable de comprendre leur répartition dans les tissus ligneux et d'évaluer, conjointement, la réponse de la plante sur ces sites de colonisation.

Ainsi, afin de visualiser *in planta*, en conditions naturelles, les deux espèces fongiques (*D. seriata* et *N. parvum*) majoritairement impliquées dans le BDA, et d'arriver à les co-localiser avec l'expression de marqueurs des défenses végétales (ciblés au regard d'études protéomiques antérieures ; Spagnolo *et al.*, 2014), nous proposons de mettre au point et de développer des analyses d'hybridation *in situ* (multi-sondes / FISH ; Bruno *et al.*, 2011 ; Colas *et al.*, 2012 ; Rozier *et al.*, 2014 ; Souza *et al.*, 2007) sur coupes histologiques de bois infecté.

Dans ce contexte, au sein d'un projet FranceAgrimer, nous travaillons à définir des sondes fluorescentes spécifiques :

- (i) de *D. seriata* et *N. parvum* : sondes de 30 à 40 pb, positionnées notamment dans les domaines D1/D2 de la grande sous-unité ribosomique 28S et utilisant la technologie « DNA Mimics » (Cerqueira *et al* 2008 ; Kubota *et al*, 2006)
- (ii) de marqueurs de défenses : sondes de 200 pb en moyenne, ciblant les transcrits d'une glutathion-S-transférase, d'une phénylalanine ammonia-lyase, d'une β 1-3 glucanase, et d'une isoflavone réductase (gènes induits dans l'interaction mourvèdre / *Botryosphaeriaceae* ; Spagnolo *et al.*, 2014).

Ces outils moléculaires seront éprouvés dans des modèles biologiques de complexité croissante, allant de l'*in vitro* à l'analyse de ceps naturellement infectés par ces *Botryosphaeriaceae* à la parcelle. A terme, ils devront également être validés dans différents cépages d'intérêt.

Références citées :

- Amponsah N. T, Jones E. E., Ridgway H. J. and M. V. Jaspers (2012) Microscopy of some interactions between *Botryosphaeriaceae* species and grapevine tissues. *Australasian Plant Pathology*. 41 (6): 665-673. doi : 10.1007/s13313-012-0159-x
- Bruno L., Muto A., Spadafora N.D., Iaria D., Chiappetta A., Van Lijsebettens M. and Bitonti M.B. (2011) Multi-probe in situ hybridization to whole mount Arabidopsis seedlings. *Int J Dev Biol*. 55(2):197-203. doi: 10.1387/ijdb.1031321b.
- Cerqueira, N. F. Azevedo, C. Almeida, T. Jardim, C. W. Keevil and M. J. Vieira (2008) DNA Mimics for the rapid identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization (FISH) *Int. J. Mol. Sci*, 9, 1944-1960
- Colas S., Jacquens L., Manteau S., Devy J., Conejero G., Clement C., Baillieul F., Mazeyrat-Gourbeyre F. and Monti-Dedieu L. (2010). Expression analysis in grapevine by In Situ Hybridization and Immunohistochemistry, p361-374. In: Grapevine analysis methods. Delrot S, Medrano H., Or E., Bavaresco L. and Grando S. Eds. Springer Springer.
- K. Kubota, A. Ohashi, H. Imachi and H. Harada (2006) Improved in Situ hybridization efficiency with Locked-Nucleic-Acid-incorporated DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 5311-5317.
- F. Rozier, V. Mirabet, T. Vernoux and P. Das (2014) Analysis of 3D gene expression patterns in plants using Whole-Mount RNA in situ hybridization. *Nature protocols* Vol 9, N°10, 2464- 2475.
- Souza, J.V.B., da Silva Júnior, R.M., Koshikene, D. and Silva, E.S. (2007) Applications of fluorescent in situ hybridization (FISH) in environmental microbiology. *Journal of Food Agriculture & Environment*. 5 (3-4): 408-411.
- Spagnolo A, Magnin-Robert M, Alayi TD, Cilindre C, Schaeffer-Reiss C, Van Dorselaer A, Clément C, Larignon P, Ramirez-Suero M, Chong J, Bertsch C, Abou-Mansour E and Fontaine F. (2014) Differential responses of three grapevine cultivars to botryosphaeria dieback. *Phytopathology*. 104 (10):1021-35. doi: 10.1094/PHYTO-01-14-0007-R.

Recherche complémentaire et validation de marqueurs moléculaires de sensibilité de la Vigne à *Eutypa lata*.

Chloé Cardot^{1, 2}, Gaétan Mappa¹, Gérald Ferrari² et Pierre Coutos-Thévenot¹

¹ Université de Poitiers, UMR CNRS 7267 EBI Ecologie et Biologie des Interactions, Equipe “SEVE Sucres & Echanges Végétaux-Environnement”, Batiment Botanique B31, 3 rue Jacques Fort - TSA 51106 - 86073 Poitiers CEDEX 9 – France.

² BNIC - Station Viticole, 69 rue de Bellefonds - BP 90018 - 16101 Cognac Cedex – France.

Contacts : chloe.cardot@univ-poitiers.fr, pierre.coutos@univ-poitiers.fr

Eutypa lata est un champignon ascomycète responsable de l'Eutypiose, une maladie de dépérissement de la Vigne. Il s'installe dans la plante par les plaies de taille, se développe dans le bois, et cause la mort du cep. Ce dépérissement est lent et entraîne des pertes de productions importantes et diminue la qualité des baies de raisins et des vins. Les cépages utilisés en Charentes sont sensibles à cette maladie. En effet, presque 10% des ceps observés en Charente en 2015 présentent des symptômes de l'Eutypiose.

Dans un besoin urgent de solutions, des recherches de marqueurs moléculaires de tolérance sont financées par le projet CASDAR V1302 et le BNIC. Pour cela, des analyses en RT-qPCR ont été entreprises pour étudier l'expression de 9 gènes préalablement sélectionnés (programme CADAR V908). Des cépages de sensibilités différentes (Merlot, Cabernet sauvignon et Ugni blanc) sont analysés dans deux parties de boutures de vigne infectées artificiellement : le bois et les feuilles.

Deux campagnes d'infections et d'analyses ont été effectuées. Parmi les résultats obtenus en première année, seuls 3 gènes semblent prometteurs. Les résultats de la campagne 2015 n'ont pas pu confirmer les résultats de la campagne de 2014, probablement à cause d'un défaut dans l'infection ou de la virulence de la souche du champignon utilisé.

Pour pallier à ces problèmes, une méthode d'infection permettant à la feuille *in vitro* et au champignon d'interagir sans contact est mise en place. Des analyses en CLHP sont effectuées pour vérifier la détection du champignon par les feuilles dans ce système. Elles permettent de mesurer la quantité de stilbènes (viniférines et resvératrol), dans les différentes conditions. Les expressions des gènes potentiellement marqueurs sont analysées en qPCR dans les feuilles issues de ce système, et les premiers résultats indiquent qu'un transporteur d'hexoses est surexprimé et un transporteur de nitrate est fortement inhibé dans les feuilles inoculées du cépage tolérant, par rapport aux feuilles témoins. D'autres analyses sont en cours pour perfectionner ce système, et des essais sur cultures cellulaires sont envisagés.

Ces recherches sont financées par le BNIC et le projet CASDAR V1302 et sont effectuées à l'Université de Poitiers.

Étude de nouvelles composantes de l'agressivité du pathogène *Eutypa lata*, cryptogame vasculaire responsable de l'eutypiose

¹ Luc P.R. Bidel, ² Loïc Le Cunff, ³ Anne Clément-Vidal, ¹ Philippe Chatelet
et ¹ Jean-Pierre Péros

¹ INRA, UMR AGAP, *Equipe DAAV* (Diversité–Adaptation et Amélioration de la Vigne), 2 place Viala, F-34060, Montpellier.

² IFV, *UMT Géno-Vigne, INRA-Montpellier SupAgro*, 2 Place Viala, F-34060, Montpellier.

³ CIRAD, UMR AGAP, avenue d'Agropolis, F-34398, Montpellier.

Contact : luc.bidel@univ-montp2.fr

L'eutypiose est une maladie de dépérissement causée par le champignon ascomycète *Eutypa lata*. Les ceps atteints présentent au printemps des rameaux rabougris portant des feuilles nécrosées. Dans le bois, la maladie se caractérise par une nécrose sectorielle qui progresse d'année en année jusqu'à la mort de la plante. *E. lata* s'attaque à de nombreux ligneux et présente un fort impact économique en viticulture. Des cépages très répandus comme Ugni Blanc et Cabernet Sauvignon sont particulièrement sensibles à la maladie. Aucune méthode curative n'existe contre le pathogène qui colonise ses hôtes après la contamination des plaies de taille par les ascospores.

Les travaux d'Octave (2006) ont montré que des fractions glycoprotéiques exsudés par *E. lata* en culture pure étaient plus phytotoxiques que l'eutypine, principale toxine jusqu'alors identifiée. Ces fractions n'avaient pas encore été caractérisées en protéomique. Afin d'identifier les peptides et les protéines toxiques pour la vigne, nous avons fractionné par chromatographie les exsudats protéiques de souches d'*E. lata* dont l'agressivité avait été caractérisée sur boutures (Péros et Berger 1994), et nous avons mesuré leur phytotoxicité sur pastilles foliaires. Plusieurs fractions protéiques induisent des nécroses, suggérant effectivement l'existence de différents composants toxiques. La taille de ces nécroses s'avère aussi corrélée avec la quantité de protéines présentes dans la fraction. De plus, lorsqu'une même fraction phytotoxique est appliquée sur une gamme de cépages de peu sensibles à très sensibles à la maladie, nous observons une corrélation entre les symptômes observés et la sensibilité estimée au vignoble (Grosman et Doublet 2012). Les travaux se poursuivent pour identifier au sein des fractions phytotoxiques les mycotoxines peptidiques et leurs cibles protéiques chez la vigne. L'ensemble de ces recherches a pour but de mieux comprendre l'interaction entre le pathogène et la plante afin de développer des outils performants pour identifier des sources de tolérance à utiliser dans de nouveaux projets d'amélioration variétale.

Grosman J., B. Doublet, 2012. Maladies du bois de la vigne. Synthèse des dispositifs d'observation au vignoble, de l'observatoire 2003-2008 au réseau d'épidémio-surveillance actuel. *Phytoma – La Défense des Végétaux* 651, 31-35.

Octave S., Roblin G., Vachaud M., Fleurat-Lessard P., 2006. Polypeptidic metabolites secreted by the fungal pathogen *Eutypa lata* participate in *Vitis vinifera* L. cell structure damage observed in Eutypa dieback. *Functional Plant Biology* 33:297-307.

Péros J-P., Berger G. 1994. A rapid method to assess the aggressiveness of *Eutypa lata* isolates and the susceptibility of grapevine cultivars to Eutypa dieback. *Agronomie* 14: 515-523.

Recherche de zones du génome impliquées dans la tolérance et/ou la résistance aux principaux pathogènes des maladies du bois au sein des variétés de vigne cultivées

Cédric Moisy, T., Flutre, A. Michon, K. Fall, G. Berger, Y. Bertrand., Luc Bidel, Loïc Le Cunff et Jean-Pierre Péros

Equipe Diversité, Adaptation et Amélioration de la Vigne (DAAV), INRA, UMR AGAP, Montpellier SupAgro, Campus La Gaillarde, Bât 21, 4ème étage, 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France

Institut Français de la Vigne et du Vin, UMT Géno-Vigne®, Domaine de l'Espiguette - 30240 Le Grau du Roi, France

Contact : cedric.moisy@supagro.inra.fr

Plusieurs études et observations au vignoble ont révélé une variation de la réponse des vignes cultivées face aux maladies du bois. Cependant, l'intervention de facteurs génétiques dans cette variabilité reste à explorer. L'identification des bases génétiques et moléculaires de la tolérance aux pathogènes responsables de ces maladies apporterait des données précieuses pour les programmes d'amélioration variétale.

Notre projet vise donc à identifier des sources naturelles de tolérance ou résistance aux principaux pathogènes pionniers impliqués dans les maladies du bois chez la vigne. Il doit aussi permettre de développer des marqueurs moléculaires utilisables dans les futurs programmes de sélection ou dans ceux actuellement développés au sein de l'UMT Geno-vigne® et de l'INRA.

Pour cela, nous avons tout d'abord développé un test de phénotypage par PCR quantitative permettant de mesurer la biomasse des trois champignons pionniers *P. aleophilum* (PAL), *P. chlamydospora* (PCH) et *E. lata* (EL) dans le bois. Nous avons ensuite utilisé cet outil pour mesurer ce caractère sur un panel de diversité de 100 génotypes de vigne sélectionnés pour représenter la diversité génétique existante au sein de l'espèce *Vitis vinifera*. Dans le cas particulier d'EL, la corrélation entre le degré d'agressivité (mesure de symptômes sur bouture) et la quantité de champignon présente dans le bois (mesure par qPCR) après inoculation a été mesurée pour 24 souches précédemment identifiées comme présentant des caractères d'agressivité extrêmes. Le séquençage des génomes complets de ces souches doit nous permettre d'identifier les zones du génome responsables des différences d'agressivité chez EL.

Les résultats préliminaires obtenus sur le panel de diversité mettent en évidence une variation de la colonisation du bois par les champignons parmi les vignes testées. La part génétique de cette variation doit désormais être estimée afin de développer une approche de génétique d'association qui permettra d'identifier les zones du génome impliquées. Une fois ces régions génomiques localisées, d'autres approches complémentaires pourront être mises en œuvre afin d'étudier la fonction de ces zones d'intérêt et de développer des marqueurs pour la sélection variétale.

Recherche de sources de résistance aux *Botryosphaeriaceae* chez la Vigne : étude de *V. vinifera* ssp. *Sylvestris*

X. Guan^{1,3}, S. Essakhi^{1,4}, Hélène Laloue¹, P. Nick², Christophe Bertsch¹ et Julie Chong¹

¹Laboratoire Vigne Biotechnologies et Environnement EA-3991, Université de Haute-Alsace, 33 rue de Herrlisheim, 68000 Colmar, France

²Botanical Institute, Molecular Cell Biology, Karlsruhe Institute of Technology, Kaiserstraße 2, 76128 Karlsruhe, Germany

³College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Tianshenglu 2, 400716 Chongqing, China

Contact : julie.chong@uha.fr

Le *Botryosphaeria dieback* représente l'une des principales maladies du bois de la Vigne. Il existe une différence de sensibilité à cette maladie entre différents cépages, ce qui se traduit par une différence d'expression des symptômes foliaires au vignoble.

Afin de rechercher des sources de tolérance utilisables en amélioration génétique, nous avons tout d'abord mis au point un système d'inoculation artificielle d'entre-nœuds détachés par *Neofusicocum parvum* et *Diplodia seriata*. La surface nécrosée a pu être mesurée dans les semaines suivant l'inoculation à l'aide du logiciel Image J et a servi d'indicateur du niveau de sensibilité. Nous avons ainsi phénotypé 25 membres de la famille des *Vitaceae* pour leur niveau de nécrose suite à l'inoculation de Np Bt67 et Ds98.1. Nous avons pu montrer une large variation des niveaux de sensibilité, sans identifier de résistance totale à ces 2 champignons. Cependant, plusieurs accessions de *V. vinifera* ssp. *sylvestris* ont montré une plus grande tolérance après inoculation artificielle. Celle-ci s'accompagne d'une expression plus intense et plus précoce de certains gènes de défense dans le bois (notamment de stilbène synthases, impliquées dans la synthèse de phytoalexines). Les feuilles de certaines accessions de *V. vinifera* ssp. *sylvestris* développent également moins de nécrose après traitement par les composés extracellulaires (contenant des toxines) produits par différents *Botryosphaeriaceae*.

L'ensemble de ces résultats montre que *V. vinifera* ssp. *sylvestris* constitue une ressource génétique intéressante dans la perspective de la création de nouvelles variétés de vigne plus tolérantes au *Botryosphaeria dieback*.

Développement d'un modèle simplifié pour l'étude des champignons associés à l'esca *in planta* : résultats et perspectives

Alban JACQUES

Equipe Agrophysiologie et Agromolécules, département des Sciences Agronomiques et Agroalimentaires, INP EI PURPAN, 75 voie du T.O.E.C. BP57611, 31076 TOULOUSE cedex 3, France.

Contact : alban.jacques@purpan.fr

Deux approches principales sont envisageables pour l'étude des maladies du bois de la vigne, et en particulier de l'esca. La première, que l'on qualifiera de systémique, s'intéresse à l'expression de ces maladies à la parcelle en intégrant le plus de facteurs possibles et ainsi aller vers la compréhension d'un pathosystème complexe dans son environnement. Elle s'inscrit dans une approche « agronomique ». La deuxième approche, que l'on qualifiera de réductionniste, s'intéresse aux interactions précises entre l'hôte et les agents associés à l'esca (*Phaeoacremonium minimum*, *P.min* ; et *Phaeomoniella chlamydospora*, *P.ch*). A PURPAN, nous nous intéressons depuis quelques années aux interactions entre *P.min/P.ch* et la vigne en suivant cette approche réductionniste. Cette présentation orale correspond à une synthèse des travaux que nous avons faits. Nous avons mis en place un pathosystème modèle : traitement d'entre-yeux ou de nœud de boutures de vigne avec les phytopathogènes associés à l'esca (Pierron *et al.*, 2016). Ce modèle nous a permis l'investigation des interactions précoces entre les tissus du bois et ces agents fongiques. A l'échelle tissulaire, nous avons observé les niches de colonisation de *P.min* dans les 12 premières semaines après infection et ainsi montré que les vaisseaux du xylème étaient colonisés dans les 3 premiers mois (Pierron *et al.*, 2015a). Nous avons montré que la présence de ces agents pathogènes modifiait la capacité de cicatrisation des tissus du bois blessé. En effet, la présence de *P.ch* dans une plaie inhibe fortement la formation d'un bourrelet cicatriciel normalement néoformé suite à une blessure (Pouzoulet *et al.* 2013a). La présence de *P.min* n'a pas d'effet sur la cicatrisation, mais en association avec *P.ch*, les 2 pathogènes donnent une réponse intermédiaire en terme phénotypique (Pierron *et al.* Submitted). A l'échelle moléculaire nous avons observé les réponses géniques dans le bois à la présence de ces champignons. Ces réponses semblent être distinguables entre *P.min* et *P.ch*, elles semblent aussi différer dans le cas d'une co-inoculation (Pierron *et al.* Submitted). En terme applicatif, ce pathosystème modèle associé à l'utilisation de la quantification par qPCR des agents fongiques au cours d'une cinétique permet une analyse de la dynamique de croissance de ces agents fongiques dans le bois au cours du temps (Pouzoulet *et al.*, 2013b). Ce modèle pourrait être utilisé dans le cadre de test de solutions possibles afin d'en vérifier l'efficacité sur la capacité de colonisation des agents associés à l'esca. Dans ce cadre nous avons montré qu'un traitement avec de l'eau ozonée de plaies de nœud inoculées avec *P.min* limitait d'environ 50% la colonisation du bois par cet agent pathogène (Pierron *et al.*, 2015b). Pour conclure, par ces utilisations aussi bien fondamentales qu'applicatives, un pathosystème en milieu contrôlé, et donc une approche réductionniste de l'étude des maladies du bois permet d'apporter à la communauté et à la filière quelques réponses quant à la compréhension toujours aussi complexe des maladies du bois de la vigne.

Références bibliographiques :

Pierron R.J.G., Gorfer M., Berger H., Jacques A., Sessitsch A., Strauss J. and Compant S. (2015a) Deciphering the niches of colonisation of *Vitis vinifera* L. by the esca-associated fungus *Phaeoacremonium aleophilum* using a gfp marked strain and cutting systems. PLoS ONE 10(6): e0126851. doi:10.1371/journal.pone.0126851.

Pierron R.J.G., Pagès M., Couderc C., Compant S., Jacques A. and Violleau F. **(2015b)** *In vitro* and *in planta* fungicide properties of ozonated water against the esca-associated fungi *Phaeoacremonium aleophilum*. *Scientia Horticulturae*, 189:184-191.

Pierron R.J.G., Pouzoulet J., Meziane A., Mailhac N. and Jacques A. **(2016)** A model for biological control studies of grapevine trunk diseases under laboratory conditions, Book chapter in [Recent advances on biocontrol of grapevine diseases: from fundamental knowledge to application in the vineyards] Eds CABI; *in press*.

Pouzoulet J., Jacques A., Besson X., Daydé 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*. *Phytopathologia Mediterranea* 52(2):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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(23):10163-10175.

Compréhension du mode d'action de l'arsénite de sodium

Philippe Larignon

IFV Pôle Rhône-Méditerranée, 7 avenue Cazeaux, 30230 Rodilhan

Contact : philippe.larignon@vignevin.com

Partenaires

URCA : Maryline Magnin-Robert, Julie Vallet, Florence Fontaine

UHA : Mary-Lorène Goddard, Céline Tarnus, Christophe Bertsch

INRA SAVE Bordeaux/Sciences Agro : Emilie Bruez, Patrice Rey

Université de Fribourg (Suisse) : Eliane Abou-Mansour

BIOGER INRA : Marc-Henri Lebrun

UMR Agroécologie Dijon : Antonin Douillet, Lucile Jacquens, Sophie Trouvelot, Marielle Adrian

Lycées agricoles de d'Avize, Rouffach et Rodilhan

L'arsénite de sodium était le seul produit efficace à l'égard de l'esca et de la Botryosphaeriose. Eu égard des travaux réalisés sur la compréhension du mode d'action de l'arsénite de sodium sur l'esca notamment dans le cadre du programme européen FAIR n°ICT-95.654 « Maîtrise de l'Esca et respect de l'Environnement 1996 – 1999 », force est de constater que son mode d'action reste encore peu connu. Suite à l'évolution des techniques (génomique, métagénomique...) et des connaissances sur les maladies du bois de la vigne (implication de nouveaux agents pathogènes, cycles biologiques des champignons mieux connus, écologie microbienne, ...), depuis ces dix dernières années, il serait important d'étudier de nouveau son mode d'action. Comprendre comment il pénétrait et se distribuait dans la plante, il empêchait l'extériorisation des symptômes herbacés, il agissait sur les microorganismes pathogènes et leur microflore accompagnatrice, et connaître son effet sur la plante sont autant de questions auxquelles il faudra répondre pour trouver un produit de substitution ou un ensemble de moyens qui permettrait de simuler son action. Pour répondre à toutes ces interrogations, le plan de recherche proposé se décline en trois sous-actions : 1) Localisation et évolution de l'arsenic dans la plante (sous-action 2), 2) son effet sur la physiologie de la plante (sous-action 3.1.) et 3) son effet sur la microflore et sur les agents pathogènes (sous-action 4).

L'expérimentation a été menée sur trois parcelles de cépage différent situées dans trois régions différentes (Avize : Chardonnay, Rouffach : Gewurztraminer, Rodilhan : Merlot). Les traitements sont réalisés uniquement sur des ceps exprimant des symptômes à l'aide d'un pulvérisateur à dos. Le produit est appliqué sur tout le cep jusqu'à ruissellement à la concentration de 1250 g/hL. Le premier prélèvement est réalisé autour de la floraison et le deuxième juste avant la vendange. Les ceps sont découpés immédiatement et le matériel végétal est destiné aux différents partenaires pour réaliser l'ensemble des analyses des sous-actions 2, 3.1. et 4. En Champagne, des ceps n'extériorisant pas de symptômes sur la partie herbacée et non traités à l'arsénite de sodium sont également analysés lors de la deuxième période de prélèvement. A noter que tous les ceps traités n'ont pas présenté de symptômes sur la partie herbacée.

Son effet sur la microflore et sur les agents pathogènes

Pour l'étude sur son effet sur les agents pathogènes et la microflore accompagnatrice, les analyses microbiologiques sont effectuées dans les différentes zones des nécroses et à

différents niveaux dans le cep (porte-greffe, greffon). La caractérisation de la microflore est réalisée selon deux méthodologies.

Les analyses par empreinte moléculaire (SSCP) montrent que les communautés fongiques et bactériennes sont semblables entre les ceps traités et non traités pour la Champagne et le Languedoc et divergent en Alsace. Une différence est notée entre les ceps malades traités ou non et ceux n'ayant pas exprimé de symptômes en Champagne pour les communautés bactériennes. Pour les différentes parties du cep, les communautés fongiques et bactériennes seraient différentes entre le tronc et les autres parties (racines, porte-greffe) pour l'Alsace et le Languedoc. Concernant la Champagne, aucune différence n'est notée pour les communautés bactériennes entre les différentes parties du cep, seule une différence est observée pour la microflore fongique entre le tronc/porte-greffe et les racines. Les analyses par pyroséquençage sont en cours.

Les isolements montrent que l'arsénite de sodium a une action sur les agents pathogènes et la microflore accompagnatrice. Il diminue les populations des champignons à l'esca (*P. chlamydospora*, *F. mediterranea*). Il augmente les populations de *Penicillium* spp., de *Trichoderma* spp et de *Fusarium* spp. Il diminue également les populations des agents pathogènes se trouvant à la surface des sarments et coursons et dans leurs tissus ligneux.

Une expérimentation en 2015 a été menée selon la même méthodologie pour confirmer ou non les premières observations.

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce à la participation du CASDAR et du CNIV.

L'efficacité de l'arsénite de sodium envers les maladies du bois de la vigne

Mary-Lorène Goddard¹, Philippe Larignon², A. Boos³ Christophe Bertsch⁴, Céline Tarnus¹ et Florence Fontaine⁵

¹Laboratoire COB, 3bis, rue Alfred Werner, 68093 Mulhouse Cedex, ²IFV Pôle Rhône-Méditerranée, 7 avenue Cazeaux, 30230 Rodilhan. ³Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), UMR 7178 CNRS, Université de Strasbourg, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg Cedex 2, ⁴LVBE EA3391, UHA, 33 rue de Herrlisheim, BP 50568, 68008 Colmar Cedex. ⁵SFR Condorcet, URCA, URVVC EA 4707, Laboratoire SDRP, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2.

Contact : mary-lorene.goddard@uha.fr

CASDAR V1301 Action 2 : Compréhension du mode d'action de l'arsénite de sodium

Sous-action 2.2 : Evolution de l'arsenic dans la plante

Expérimentation : 10 ceps sur 3 parcelles ont été traitées à l'arsénite de sodium en février-mars 2014 dans 3 régions différentes sur trois cépages différents : Languedoc (Merlot), Champagne (Chardonnay), Alsace (Gewurtztraminer). En juin 2014, 5 ceps traités ont été prélevés ainsi que 5 ceps témoins, de même en septembre 2014. L'échantillonnage a été réalisé sur 15 zones dans les ceps (Schéma 1).

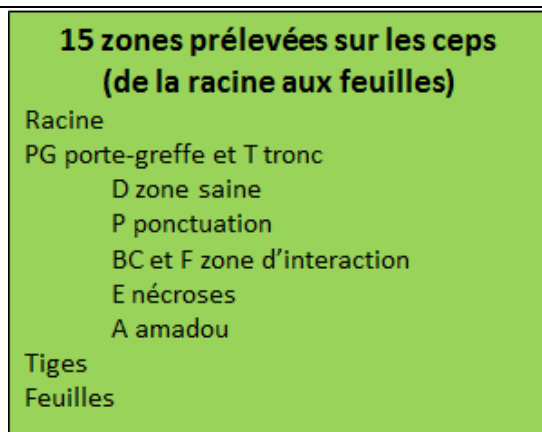


Schéma 1 : liste des zones prélevées dans les ceps

Localisation de l'arsenic : La teneur en arsenic total est déterminée par ICP-MS après lyophilisation et minéralisation liquide des échantillons. Concernant les ceps témoins, il n'y a pas de différences significatives pour la teneur en As totale entre les deux temps de prélèvement, les cépages et les organes. Pour les ceps traités, il n'y a pas d'effet cépage. Par contre, en juin la teneur en As est très importante dans les zones nécrosées et amadou. Elle est non négligeable dans les feuilles et faible dans les autres zones prélevées. Cette

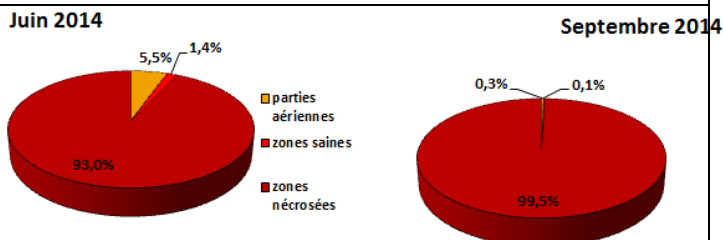


Schéma 2 : répartition de l'arsenic dans les différentes zones sur les échantillons dosés entre juin et septembre 2014

différence s'accroît dans le temps puisque la teneur en As augmente entre juin et septembre dans les zones nécrosées et amadou et qu'elle diminue dans les autres zones (Schémas 2 et 3).

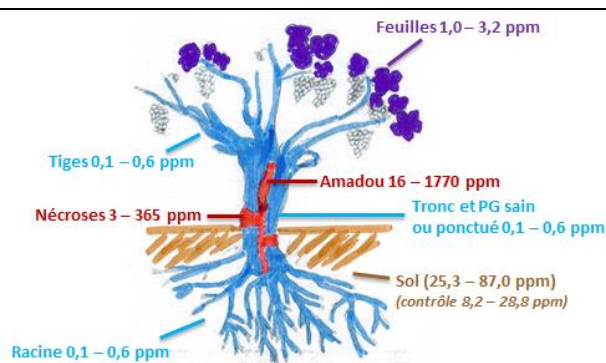


Schéma 3 : localisation et teneurs en arsenic dans les ceps en septembre 2014

Spéciation de l'arsenic : la spéciation est en cours. La méthode d'extraction est mise au point et les premiers essais de séparation chromatographiques ont été réalisés.

Résultats préliminaires de l'effet de l'arsénite de sodium sur la physiologie de la vigne

Julie Vallet¹, Aurélie Songy¹, P. Papon¹, Maryline Magnin-Robert¹, Christophe Bertsch², Mary-Lorène Goddard³, Céline Tarnus³, Emilie Bruez⁴, Patrice Rey⁴, Marc-Henri Lebrun⁵, Christophe Clément¹, Philippe Larignon⁶ et Florence Fontaine¹

¹SFR Condorcet, URCA, URVVC EA 4707, Laboratoire SDRP, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France. ²LVBE EA 3391, UHA, 33 rue de Herrlisheim, BP 50568, 68008 Colmar cedex. ³Laboratoire COB, 3 rue Alfred Werner, 68200 Mulhouse, ⁴UMR 1065 SAVE, INRA/Bordeaux Sciences Agro, 33883 Villenave d'Ornon. ⁵UMR 1290 BIOGER, INRA AgroParisTech, Ave. L. Bretignières, 78850 Thiverval Grignon, ⁶IFV Pôle Rhône-Méditerranée, Domaine de Donadille, 30230 Rodilhan.

Contact : florence.fontaine@univ-reims.fr

Pour cette étude, nous avons utilisé deux modèles, un modèle simplifié, des plants greffés soudés, et le vignoble pour évaluer l'effet du traitement arsénite de sodium sur la physiologie de la vigne.

Dans le cas des greffés soudés cv Tempranillo, nous avons utilisé 10 plants non inoculés et non traités ainsi que 10 plants traités à l'arsénite de sodium et inoculés avec des *Botryosphaeriaceae*. Ces derniers ont été traités en mars 2015 (2 semaines avant débourrement) et 2 prélèvements ont été effectués, en juin (floraison) et septembre (avant vendanges) 2015. Nous avons suivi plusieurs paramètres dont la croissance de l'appareil végétatif et racinaire, un suivi de l'activité photosynthétique de mai à août 2015, ainsi que des ré-isolements de champignons, ceux inoculés et d'autres, et un suivi de l'expression de gènes cibles. Les principaux résultats sont les suivants : les plants traités à l'arsénite ont moins de tiges et elles étaient plus petites (longueur et diamètre) que les plants non traités. Le système racinaire est également réduit. L'arsénite semblerait donc inhiber la croissance des plants.

Une forte altération de l'activité photosynthétique jusqu'à 4 mois après traitement a été observée. En effet, la photosynthèse nette diminue pour les plants traités en lien avec une diminution de la conductance stomatique et de l'évapotranspiration ; toutefois, l'activité du photosystème II reste inchangée. A partir de 4 mois, la tendance est inversée, il y a une reprise de l'activité photosynthétique chez les plants traités ; cette activité est supérieure à celle des plants non traités. Les analyses fongiques ont permis de ré-isoler toutes les souches de *Botryosphaeriaceae* inoculées dans la majorité des cas. L'analyse transcriptomique a permis de mettre en évidence une activation de l'expression des gènes de détoxification (SOD, GST1) et de défense (CHV5) au niveau des feuilles, des tiges ou des racines.

Au vignoble, l'étude porte sur 3 cépages, Chardonnay, Merlot et Gewurztraminer, et 4 campagnes de prélèvements ont été réalisées sur 2014 et 2015. Les résultats présentés portent sur les échantillons 2014 et ne concernent que le suivi de l'expression de gènes cibles. En juin 2014, nous pouvons observer différentes réponses au traitement à l'arsénite selon les cépages ; les feuilles semblent être les moins affectées, il y a une activation de l'expression des gènes de défense et de détoxification dans le bois et les tiges herbacées mais une répression dans les racines. L'expression de GST1, STS et CHV5 varie le plus pour les 3 cépages en réponse au traitement. En septembre 2014, nous observons chez le Chardonnay un rôle éliciteur de l'arsénite dans le bois sain et ponctué et une activation de la défense directe contre les champignons. Les échantillons de Chardonnay font l'objet d'une analyse RNAseq pour compléter ces résultats.

En conclusion préliminaire, l'effet fongicide de l'arsénite de sodium est confirmé (exposé P. Larignon). De plus, la physiologie de la vigne est fortement altérée suite à ce traitement, ces perturbations sont plus ou moins marquées selon les organes de la vigne en lien avec les concentrations retrouvées (exposé ML Goddard). Ces données doivent être confirmées par les analyses des échantillons de la campagne 2015 (vignoble) et la répétition de l'expérimentation sur modèle greffés-soudés en 2016.

Etude de l'impact d'un traitement à l'arsénite de sodium sur la vigne : caractérisation des répercussions tissulaires et cellulaires induites dans le végétal

Antonin Douillet¹, Lucile Jacquens², Marielle Adrian², Philippe Larignon¹, Florence Fontaine³ et Sophie Trouvelot²

¹ Institut Français de la Vigne et du Vin, 7 avenue Cazeaux, 30230 Rodilhan, France.

² Université de Bourgogne, UMR 1347 Agroécologie, ERL CNRS 6300, BP 86510, 21000 Dijon, France.

³ Université de Reims, Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne, URVVC EA 4707, 51097 Reims Cedex, France

Contact : sophie.trouvelot@u-bourgogne.fr

Dans le passé, l'arsénite de sodium (AsS) permettait de contenir l'expression des maladies du bois et de réduire les pertes de production. Depuis le retrait de son homologation en 2001, aucune solution curative de remplacement (*i.e.* d'efficacité comparable) n'a pu être proposée à la profession. Dans ce contexte, il apparaissait nécessaire d'approfondir les connaissances sur le mode d'action de l'AsS vis-à-vis des champignons et de la vigne afin d'envisager des traitements de substitution pouvant mimer ses effets. L'objectif de cette étude, qui s'inscrit plus largement dans un programme de recherche CASDAR (Compte d'Affectation Spéciale « Développement Agricole et Rural », V1301), est d'apporter des éléments de compréhension de l'effet du traitement à l'AsS dans le pathosystème vigne/complexé fongique de l'Esca, à l'échelle cellulaire. En conséquence, nous avons cherché à éprouver et décrire, sur Chardonnay, l'impact d'un traitement à l'AsS (i) au niveau tissulaire d'organes de vigne (feuilles et bois du greffon notamment) et (ii) au niveau d'organites cellulaires.

Dans les zones d'interaction (nécrose dure / partie saine) du bois, 7 mois post-traitement, des observations en microscopie à épifluorescence, microscopie électronique à balayage et microscopie à détection X ne révèlent pas de différences majeures entre les échantillons symptomatiques et ceux, asymptomatiques, préalablement traités à l'AsS. En revanche, comparativement aux modalités non traitées, le traitement à l'AsS semble avoir, à ce même temps de prélèvement, des effets sur les cellules du tissu foliaire. En effet, l'observation en microscopie électronique à transmission de ces échantillons montre notamment *i-* une vacuolisation dans certaines cellules du parenchyme palissadique, *ii-* la présence de précipités denses aux électrons (arsenic ?) dans quelques vacuoles et *iii-* la présence de chloroplastes visiblement altérés (thylakoïdes fortement affectés) arborant des plastoglobules plus nombreux et de plus grande taille que dans la modalité non traitée asymptomatique. De plus, des observations en microscopie à épifluorescence ont montré une auto-fluorescence notamment *i-* au sein de cellules positionnées au centre du mésophylle et *ii-* au niveau des chloroplastes des cellules du parenchyme palissadique. L'intensité de cette fluorescence est statistiquement intermédiaire entre celle détectée dans les feuilles de ceps asymptomatiques (quasi-nulle) et celle révélée dans les feuilles de ceps symptomatiques (plus forte).

Il est connu que l'As provoque un stress oxydatif *in planta*. Selon des dosages d'arsenic total, effectués au sein de l'Université de Haute-Alsace (M-L. Godard) sur ces mêmes modalités, des teneurs avoisinant les 60 ppm ont pu être détectées dans les tissus foliaires 5 mois post-traitement et une dynamique de remobilisation de l'As *in planta* est observée entre 5 et 7 mois post-traitement, concomitamment avec la mise en réserve des composés glucidiques. Il est par conséquent possible que nos observations reflètent la résultante de cette remobilisation tardive, dans les tissus foliaires, de doses inférieures à 50 ppm. Conformément

à la littérature, cela expliquerait (i) pourquoi une altération chloroplastique est observée dans nos échantillons (Simola, 1977 ; Li *et al.*, 2006) et (ii) pourquoi cette dernière pourrait paraître de plus faible amplitude que celle observée pour les ceps symptomatiques (stress oxydatif lié à la perception de toxines), les altérations profondes étant généralement observées pour des teneurs en As supérieures à 300 ppm (Li *et al.*, 2006).

Références citées :

- Li Y., Heaton A., Carreira L., Meagher R. 2006. Enhanced tolerance to and accumulation of mercury, but not arsenic, in plants overexpressing two enzymes required for thiol peptide synthesis. *Physiologia Plantarum*. 128 : 48–57.
- Simola L.K. 1977. The effect of lead, cadmium, arsenate, and fluoride ions on the growth and fine structure of *Sphagnum nemoreum* in aseptic culture. *Revue canadienne de botanique*. 55 : 426-435.

Exploiter la diversité pour mieux comprendre les maladies du bois.

Jean-Pierre Péros

UMR AGAP INRA Equipe Diversité Adaptation et Amélioration de la Vigne
2, place Viala 34060 Montpellier cedex
Contact : jean-pierre.peros@supagro.inra.fr

Les maladies du bois expliquent en partie le dépérissement du vignoble. Leur analyse doit prendre en compte les connaissances assez nombreuses déjà acquises chez d'autres plantes pérennes : classification des multiples facteurs qui interviennent, existence d'une compartimentation dans le bois, efficacité de différentes barrières s'opposant à la progression des champignons, et structure et fonctionnement de la communauté fongique. Pour avancer dans les recherches sur la vigne et identifier les facteurs les plus importants, il est proposé tout d'abord d'exploiter la grande variabilité de l'incidence selon les parcelles. La progression des pertes au cours du temps est en effet très variable d'une parcelle à l'autre même très proches. La perception du problème et le seuil d'acceptabilité peuvent être très différents selon les viticulteurs. Par exemple, des symptômes discrets d'eutypiose visibles uniquement au printemps sont bien plus insidieux qu'une apoplexie brutale due à l'esca pendant la phase de maturation du raisin. A l'échelle du cep, une diversité importante existe également pour l'expression des symptômes externes, l'importance et la localisation des parties du cep colonisées par les champignons (facteur contributif). Les symptômes externes, s'ils existent, ne donne qu'un aperçu très limité de la structure et du fonctionnement de la communauté fongique dans le bois. Le point crucial a été d'identifier au sein de la communauté fongique des espèces pionnières qui débute la dégradation du bois et contre lesquels la lutte devrait être menée en priorité (*Phaemoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Eutypa lata*). L'analyse génétique des populations de ces espèces à différentes échelles géographiques a permis de préciser les modes de reproduction et de propagation. Ainsi, *E. lata* est une espèce hétérothallique dont la propagation est assurée uniquement par les spores sexuées. Chaque cep malade héberge un individu génétiquement différent et les individus varient fortement pour leur agressivité. Le matériel végétal est un des facteurs favorisant prépondérants avec en particulier un effet du cépage sur l'efficacité des barrières à la colonisation et sur la détoxification des productions fongiques. Une autre direction possible pour les recherches serait d'analyser de façon conjointe la diversité des cépages et la diversité des espèces pionnières. En mobilisant des méthodes précises de phénotypage et différentes approches (génétique, physiologie), l'objectif serait de valider simultanément les composantes de la tolérance de la vigne et les composantes de l'agressivité des champignons. Cette connaissance plus fine des interactions pourrait déboucher sur des marqueurs utilisables pour identifier des cépages plus tolérants aux espèces pionnières parmi les cépages actuels ou issus de nouveaux programmes de sélection.

Synthèse et étude du transport de profongicides en vue de contrôler les maladies vasculaires.

Hanxiang Wu¹, S. Marhadour¹, Jean-Louis Bonnemain² et Jean-François Chollet¹

¹IC2MP (Institut de Chimie des Milieux et des Matériaux de Poitiers), UMR CNRS 7285, Université de Poitiers, 4 rue Michel Brunet, TSA 51106, F-86073 Poitiers CEDEX 9, France.

²Laboratoire EBI (Écologie et Biologie des Interactions), UMR CNRS 7267, Équipe SEVE (Sucres, Échanges Végétaux, Environnement), Université de Poitiers, 3 rue Jacques Fort, TSA 51106, F-86073 Poitiers CEDEX 9, France.

Contact : jfcholle@univ-poitiers.fr

Après l'interdiction de l'arsénite de sodium en 2001, les maladies du bois, et plus particulièrement l'esca et le BDA, ne cessent de progresser sans qu'aucune solution ayant une efficacité comparable ne soit proposée. La plupart des viticulteurs en activité ont utilisé l'arsénite de sodium pour contrôler les maladies du bois et, pour leur grande majorité, sont très clairement en attente d'un produit de substitution. Il est donc nécessaire de trouver un nouveau produit alternatif ayant une bonne activité contre les champignons responsables des maladies du bois.

L'absorption et la distribution de fongicides dans les plantes ont une influence déterminante sur leur activité à l'égard des agents pathogènes localisés dans les tissus vasculaires. Le but de nos recherches est de développer des fongicides foliaires qui puissent être transportés vers les tissus vasculaires. Nous avons proposé deux stratégies pour développer des profongicides systémiques à partir d'une molécule commerciale non-mobile modèle, le fenpiclonil. Sur ce dernier, nous allons greffer un groupe qui va permettre la vectorisation de la molécule au sein de la plante. L'objectif est ensuite d'avoir une métabolisation soit par la plante, soit par les champignons parasites de ces prodrogues en fongicide actif *in situ*, en l'occurrence le fenpiclonil.

Dans un premier temps, nous avons ajouté une chaîne porteuse d'une fonction acide carboxylique, permettant ainsi d'exploiter le mécanisme bien connu du piégeage d'acide. Plusieurs dérivés acides et deux esters de fenpiclonil ont été synthétisés, ces derniers permettant un meilleur franchissement cuticulaire. Après vérification de leur stabilité en milieu aqueux, nous avons montré que les esters sont métabolisés par la plante en donnant les acides carboxyliques correspondants qui sont mobiles dans des tubes criblés.

Dans un second temps, nous avons couplé le fenpiclonil à un nutriment (acide aminé ou sucre) dans le but de leurrer les transporteurs de la membrane plasmique en leur faisant manipuler les conjugués ainsi obtenus. Nous avons ainsi obtenu une association fenpiclonil-lysine et un dérivé fenpiclonil-glucose, un espaceur étant présent dans les deux cas entre le fongicide et le nutriment. Ces deux conjugués sont retrouvés dans la sève phloémienne, ce qui valide notre stratégie, mais les résultats préliminaires indiquent que le couplage avec un alpha-aminoacide permettrait une meilleure vectorisation que celui avec un sucre.

Notre étude suggère donc qu'une modification du fongicide modèle fenpiclonil en exploitant soit le mécanisme de piégeage d'acide soit le mécanisme de transport actif, est une approche valide pour développer de nouveaux fongicides systémiques. Les tests d'efficacité

biologique, combinant fongicides systémiques et bactéries antagonistes, sur des vignes contaminées artificiellement (modèle dit “simplifié”) sont effectués en collaboration avec l’équipe du Dr Florence Fontaine à l’Université de Reims Champagne-Ardenne.

Les auteurs remercient FranceAgriMer, InterLoire and JAS Hennessy & Co. pour le support financier de ces travaux.

Maladies du bois de la vigne : mise au point d'un modèle simplifié en vue de tester des moyens de lutte

Alessandro Spagnolo¹, Hanxiang Wu², Jean-François Chollet², Christophe Clément¹ et Florence Fontaine¹

¹SFR Condorcet, Université de Reims Champagne-Ardenne, URVVC EA 4707, Laboratoire Stress, Défenses et Reproduction des Plantes, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France.

²IC2MP (Institut de Chimie des Milieux et des Matériaux de Poitiers), UMR CNRS 7285, Université de Poitiers, 4 rue Michel Brunet, TSA 51106, F-86073 Poitiers cedex 9, France.

Contact : alessandro.spagnolo@univ-reims.fr

Compte tenu de l'impact économique croissant des maladies du bois de la vigne sur la viticulture, l'identification de stratégies de contrôle efficaces et viables est urgente. Cependant, la compréhension des interactions plante-pathogène et des changements physiologiques de la plante liés à ces maladies est essentielle pour un tel accomplissement. Pour répondre à cet objectif, un modèle simplifié qui implique l'utilisation des boutures racinées cultivées en serre a été mis en place pour: i) étudier l'effet de l'infection artificielle avec les agents du « Black Dead Arm » (BDA), *Neofusiccous parvum* et *Diplodia seriata*, sur la physiologie de la plante (Chardonnay, Sauvignon) et ii) évaluer l'efficacité d'une stratégie de contrôle impliquant la combinaison d'un agent potentiel de lutte biologique et un fongicide systémique. Ainsi, la bactérie endophytique *Burkholderia phytofirmans* (souche PsJN :: *gfp2x*) a été testée comme agent de lutte biologique et appliquée dans le sol quatre (T-28j) et trois (T0-21j) semaines avant l'infection fongique artificielle. Ensuite, le dérivé du fongicide Fenpiclonil "SM 26" utilisé comme fongicide a été appliqué au niveau des feuilles à l'aide d'un pinceau une ou plusieurs fois deux jours avant (T0-2j) l'inoculation fongique. L'inoculation fongique (T0) a été effectuée sur la tige herbacée sous l'une des feuilles traitées avec le fongicide et a consisté en l'application d'un implant mycélien au niveau d'une blessure réalisée avec un emporte-pièce. Une feuille apicale a été récoltée 48h après la dernière application du fongicide afin d'étudier son caractère systémique et la métabolisation dans la plante. Pour évaluer l'effet phytoprotecteur de *B. phytofirmans* et/ou du fongicide, l'expression d'un panel de gènes cibles (défense, réponse aux stress oxydatifs etc.) dans les feuilles à T0+4j et T0+8j, et la tailles des lésions induites suite à l'infection fongique artificielle à T0 + 60j ont été étudiées. De plus, dès T0+4j et une fois par semaine, l'activité du photosystème II a été mesurée afin de caractériser l'effet de l'inoculation bactérienne, du traitement avec le fongicide ou de l'infection fongique sur les boutures. Les premiers résultats indiquent que: i) aucun effet sur l'activité du PSII a été induite par les différents traitements et ii) aucun effet significatif du traitement avec *B. phytofirmans* ou SM26 a été enregistré sur la taille des lésions suite aux infections par *D. seriata* et *N. parvum*. Cependant, un effet synergique des deux traitements (*B. phytofirmans* +SM26) est à noter, en particulier pour les boutures inoculées avec *N. parvum*. Cet effet synergique peut être dû à l'activité antifongique directe et / ou à l'effet éliciteur de un ou des deux traitements lorsqu'ils sont appliqués ensemble. Ces résultats préliminaires sont en cours de validation.

Colonisation par l'agent de biocontrôle, *Pythium oligandrum*, de la rhizosphère de jeunes plants de vigne greffés et protection contre *Phaeomoniella chlamydospora*

Amira Yacoub^{1,2,3}, Jonathan Gerbore⁴, David Renault^{1,2}, Emilie Bruez^{2,1}, Jessica Vallance^{1,2}, Antonin Douillet^{1,2}, Daniele Candido Da Costa^{1,2}, Remy Guyoneaud³ et Patrice Rey^{2,1}

¹ INRA, ISVV, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE), F-33140 Villenave d'Ornon, France

² Université de Bordeaux, ISVV, UMR1065 SAVE, Bordeaux Sciences Agro, F-33140 Villenave d'Ornon, France.

³ UMR CNRS 5254/IPREM-EEM, IBEAS, Université de Pau et des Pays de l'Adour, 64013 Pau, France.

⁴ BIOVITIS, 15400 Saint Etienne de Chomeil, France.

Contacts : amira.yacoub@bordeaux.inra.fr, patrice.rey@agro-bordeaux.fr

Les micro-organismes utilisés comme agents de biocontrôle représentent une voie alternative à l'utilisation des pesticides chimiques. Cependant, pour exercer une protection efficace du végétal un agent de biocontrôle doit s'implanter et persister sur celui-ci, si possible sans perturber la microflore indigène non-pathogène déjà établie. Lors de cette étude, un oomycète isolé à partir de la rhizosphère de la vigne, *Pythium oligandrum*, a été utilisé pour protéger cette plante contre un agent pathogène impliqué dans l'esca, *Phaeomoniella chlamydospora*.

La rhizosphère de portes greffes (SO4, 3309 et 101-14) greffés sur des cépages (Cabernet Sauvignon et Sauvignon Blanc) a été inoculée ou non par *P. oligandrum*. L'estimation par méthode culturale et par qPCR de la colonisation de *P. oligandrum* au niveau des systèmes racinaires a montré que *P. oligandrum* est présent sur les racines, mais en proportion variable selon les associations cépage/porte-greffe utilisées. Chaque porte-greffe présente un taux de colonisation des racines par *P. oligandrum* différent selon l'association ou non avec le Sauvignon Blanc et le Cabernet Sauvignon. Les analyses par empreintes moléculaires (Single Strand Conformation Polymorphism) ont montré que des microflore fongiques et bactériennes complexes et diversifiées colonisaient les feuilles et les racines. La spécificité des communautés selon les organes a été confirmée. L'introduction de *P. oligandrum* dans la rhizosphère n'a pas exercé de bouleversements notables au niveau de ces microflore indigènes. Une protection des jeunes plants de vigne greffés (SO4 + Cabernet Sauvignon) semble être induite par *P. oligandrum* contre l'agent pathogène, *P. chlamydospora*.

Screening de bactéries antagonistes de deux champignons impliqués dans les maladies du bois de la Vigne

Rana Haidar, Jean Roudet, Alain Deschamps et Marc Fermaud

INRA, UMR1065 Santé & Agroécologie du Vignoble, ISVV, Université de Bordeaux, CS 20032, 33882 Villenave d'Ornon Cedex, France

Contacts : rana.haidar@bordeaux.inra.fr, marc.fermaud@bordeaux.inra.fr

L'objectif des travaux a été de cribler des souches bactériennes, isolées de Vigne, pour leur pouvoir antagoniste vis à vis deux espèces fongiques pathogènes majeures : i) *Neofusicoccum parvum* et ii) *Phaemoniella chlamydospora*. Le criblage a été fait par la méthode de co-inoculation sur boutures foliées en croissance de vigne en serre. La co-inoculation impliquait une bactérie candidate (46 souches ont été préalablement testées), sous forme de suspension cellulaire) et l'un des deux champignons, sous forme de plug mycélien : *N. parvum* ou *P. chlamydospora*.

Les mesures de symptômes, lésions nécrotiques internes dans le bois et chancres externes, dûs à *N. parvum*, ont montré la capacité de certaines bactéries à diminuer significativement ces symptômes. Les taux d'inhibition de cinq souches (S1, S2, S3, S4, S24) en présence du champignon étaient significativement différents ($P = 0,05$) en comparaison avec les plantes témoins inoculées seules avec le champignon (UC). Leur efficacité, en diminuant la longueur de la lésion nécrotique interne, varie entre 32,3% et 43,5%. Parmi ces cinq souches, quatre souches (S1, S2, S3, S4) appartiennent au genre *Pantoea* sp.. Une corrélation significative et positive a été aussi observée entre la longueur de la nécrose et la longueur du chancre.

L'évaluation du potentiel antagoniste des souches bactériennes contre *P. chlamydospora* a montré la capacité de 8 souches à diminuer significativement la longueur de nécrose dans le bois suite à l'inoculation avec *P. chlamydospora*. La souche S24 (*Enterobacter* sp.), qui montre la meilleure efficacité, est aussi l'une des souches les plus antagonistes contre *N. parvum*. Par contre, d'autres souches, comme S1 et S2 n'ont pas présenté un pouvoir antagoniste très important vis-à-vis *P. chlamydospora*.

Ainsi, nos résultats ont permis de distinguer des différences entre les souches bactériennes dans leur pouvoir à inhiber les symptômes en fonction du modèle de champignons pathogènes considéré.

Avec les mêmes 46 souches bactériennes, d'autres screenings sur baies (contre *N. parvum* et *Botrytis cinerea*) ainsi que sur feuilles (contre *B. cinerea*) nous ont montré que l'organe hôte et l'espèce de pathogène interfèrent avec l'efficacité antagoniste des bactéries.

Des études supplémentaires sur la formulation d'un potentiel produit de biocontrôle et les modes d'application des bactéries sont nécessaires pour améliorer l'efficacité des souches bactériennes d'intérêt.

Nouveaux essais sur les maladies du bois en Bourgogne

Claire Grosjean et Guillaume Morvan

Chambre régionale d'agriculture de Bourgogne – Franche-Comté, Site Bretenière, 1 rue des Coulots - 21110 Bretenière

Chambre d'agriculture de l'Yonne, 62 rue Guynemer, 89000 Auxerre

Contacts : Claire.GROSJEAN@bourgogne.chambagri.fr, g.morvan@yonne.chambagri.fr

Les résultats obtenus grâce au réseau d'essais suivi depuis 2009 sont utilisés dans la mise en place d'itinéraires intégratifs afin, soit de récupérer des parcelles fortement expressives, soit de faire des plantations nouvelles permettant d'allonger la durée de vie moyenne des plants.

Les trois nouveaux objectifs 2015 se traduisent en trois hypothèses :

- Tester d'itinéraires intégratifs sur des vignes touchées :

L'objectif est de voir si l'addition de pratiques culturales respectant l'intégrité du cep tout en essayant de pallier à des phénomènes perturbateurs de l'équilibre physiologique de la vigne (forte chaleur, fertilisation...) permettrait de diminuer l'impact des maladies du bois. Trois parcelles ont été repérées en été 2014 (deux dans l'Yonne, une en Saône-et-Loire) et ont fait l'objet de comptage d'expression pied à pied pour faire office de point zéro. Un changement d'itinéraire cultural a été donné au viticulteur sur une moitié de la parcelle (l'autre restant dans l'itinéraire traditionnel du viticulteur comme témoin).

- Test d'itinéraire intégratif dès la plantation :

Une parcelle a été plantée au printemps 2015 sur le vignoble expérimental de la chambre d'agriculture de l'Yonne à Beines avec les modalités suivantes :

- zone témoin, plantée en Chardonnay 96 sur 41 B, faible densité de plantation (5 900 ceps / ha) et taille Chablis haute sans respect particulier des circuits de sève, formation des pieds à la taille, ébourgeonnage floraison ou post floraison,
- zone "MDB –" (= « maladies du bois moins ») dont l'objectif est de diminuer l'expression des MDB, plantée en Chardonnay 96 sur 41 B, forte densité (11 000 ceps / ha) et taille Chablis basse et respectant les circuits de sève et l'équilibre de la souche, ébourgeonnage préfloraison, formation des pieds en vert.

Les deux modalités précédentes sont doublées sur un porte-greffe expressif : le Fercal (forte expression apoplectique) afin de tester les limites de l'effet de ces pratiques. Chaque modalité fait 1 300 plants qui proviennent tous d'un même lot chez un seul pépiniériste.

- Test de l'impact des conditions climatiques et culturales sur l'évolution sanitaire d'un même lot.

Au printemps 2015, une plantation a été effectuée dans le vignoble expérimental de la chambre d'agriculture de l'Yonne à Beines et dans une parcelle en appellation Crémant de

Bourgogne chez un viticulteur avec des plants de Chardonnay 131 sur 41 B. Ces plants (3 000 pour l'Yonne) proviennent d'un unique lot de Chardonnay 131/41 B produit par le CIVC et séparé juste avant plantation en deux sous-lots, l'un planté en Champagne et l'autre planté dans l'Yonne. Les trois plantations seront ensuite suivies sur des paramètres agronomiques et sanitaires selon des protocoles communs pour mesurer les évolutions futures de ces parcelles vis-à-vis de l'expression des maladies du bois.

Une collaboration avec l'Université de Reims Champagne Ardennes, Laboratoire Stress, Défenses et Reproduction des Plantes et l'équipe de Florence FONTAINE et l'INRA Dijon, groupe résistance induite et l'équipe de Marielle ADRIAN, se met en place. L'objectif est de travailler sur les mêmes parcelles afin que les deux équipes de recherche puissent valider au vignoble les données de transcriptomique, protéomique et métabolomique obtenus en laboratoire. La Chambre d'agriculture du Bourgogne se charge de réaliser des mesures agronomiques et sanitaires sur les pieds/parcelles analysés par les deux équipes de recherche. L'objectif final est de pouvoir mieux comprendre une situation sur le terrain pour la généraliser à un ensemble de situation.

Influence du fonctionnement interne du cep sur l'expression des symptômes Esca/BDA

Gaël Delorme

Chambre d'agriculture du Jura, Société de Viticulture du Jura, 455 rue du Colonel de Casteljaou, B.P. 40417, 39016 Lons le saunier Cedex.

Contact : gael.delorme@jura.chambagri.fr

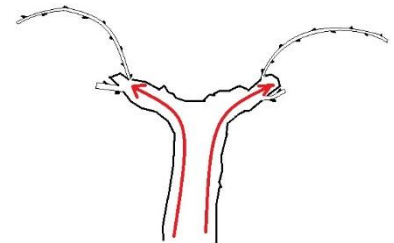
Le contexte technique et économique lié aux maladies du bois (Esca/BDA essentiellement) est très préoccupant. C'est particulièrement le cas dans le vignoble du jura avec les deux cépages, Savagnin et Trousseau, parmi les plus touchés au niveau national.

La Société de Viticulture travaille un nombre relativement important de sujets et expérimentations sur l'ESCA/BDA. Une des recherches importante porte sur la relation entre le fonctionnement interne du cep et l'expression de l'Esca et BDA.

Contexte de l'étude :

La taille dite "respectueuse" ou Guyot Poussard est en plein essor sur le vignoble jurassien, basée sur le respect des 2 flux de sève principaux et de la limitation des entraves de la sève.

La Société de Viticulture du Jura souhaite, grâce à une approche descriptive, étudier statistiquement l'influence du fonctionnement interne des ceps sur l'expression des symptômes Esca/BDA.



Les deux flux de sève principaux d'un cep de vigne

1^{ère} étape de l'étude :

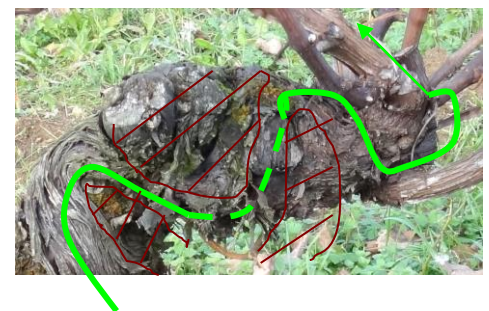
Sur 2 années, mettre en relation des critères de caractérisation du fonctionnement interne des ceps (basés sur la logique de la taille Guyot Poussard) et l'intensité des symptômes d'Esca/BDA :

Population retenue : 481 ceps en 2013 et 625 en 2014 sur 5 parcelles identiques ces deux années (savagnin et trousseau). Chaque cep est considéré comme un individu statistique.

Ainsi 2 observations par saison sont réalisées :

- une en automne pour qualifier l'intensité des symptômes de chaque cep étudié.
- une après chute des feuilles pour caractériser le fonctionnement interne avec 3 critères :
 - Le nombre de flux principaux sur le tronc principal (1 ou 2),
 - Le nombre total d'inversions de sève sur l'ensemble du cep (chiffre variable),
 - Note globale de fonctionnement interne (sur 6 niveaux)

Ce dernier critère est moins factuel mais reste le plus pertinent pour qualifier globalement les



Inversions de sève induites par l'historique de la taille qui ont de grosses conséquences sur la circulation interne.

dysfonctionnements internes d'un cep : "Visualiser de l'extérieur ce qui se passe à l'intérieur"

Résultats :

Sur ces 2 années de résultats, où chaque parcelle est étudiée individuellement, pour les critères "nombre de flux principaux" et "nombre total d'inversions" aucune tendance ne ressort statistiquement.

Par contre pour le dernier critère ; il ressort, sur 10 analyses statistiques 3 corrélations positives et 2 tendances assez fortes.

Néanmoins dans ces 2 années, les coefficients de corrélation ne sont pas très élevés.

Parcelle	P Value	Coeff. Corrélation
A	0,006	0,3
B	0,41	0,08
C	0,08	0,17
D	0,02	0,25
E	0,45	0,08

Parcelle	P Value	peff. Correlatic
A	0,52	-0,06
B	0,93	0,01
C	0,01	0,21
D	0,88	0,01
E	0,07	0,15

2nde étape de l'étude :

Elargir le champ d'étude : une parcelle considérée comme un individu.

25 parcelles étudiées, toujours en savagnin et trousseau.

2 observations par saison:

- une en automne sur symptômes (4 placettes de 30 ceps)
- une en hiver sur la note globale fonctionnement interne sur 100 ceps d'origine (+ taux de ceps d'origine).

L'intérêt d'élargir cette population étudiée est de pouvoir confronter divers critères à l'impact Esca/BDA, dont ;

- cépage (trousseau/savagnin)
- pratique (différences inter-parcellaires)
- Age des parcelles
- Moyenne des notes globales de fonctionnement interne

L'acquisition de données est en cours ; les résultats à suivre.

Tests de Spearman sur la corrélation entre la note globale de fonctionnement interne du cep et intensité des symptômes : résultats 2013 tableau de gauche et 2014 à droite.

Le Curetage

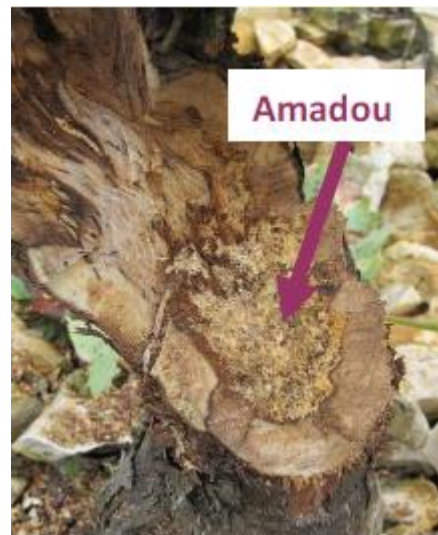
Marie Thibault

Service Interprofessionnel de Conseil Agronomique, de Vinification et d'Analyses du Centre
Contact : marie.thibault@sicavac.fr

Le curetage est une technique curative contre l'esca-BDA. Celle-ci était déjà employée par Poussard au début du 20e siècle et est reprise depuis une quinzaine d'années par un viticulteur sancerrois avec une très bonne réussite. Il s'agit de cureter l'amadou (bois jaune et tendre) dans les ceps atteints de formes lentes esca - BDA. Ce curetage se pratique à l'aide d'une petite élagieuse. Aujourd'hui de nombreux viticulteurs du Centre-Loire s'essaient à cette technique prometteuse.

Principe du curetage

Tous les ceps atteints d'esca - BDA peuvent être curetés. L'objectif est de **supprimer l'amadou**, c'est-à-dire le bois jaune et tendre, **en évitant au maximum de couper les courants de sève fonctionnels**. Il faut être très rigoureux sur la suppression totale de l'amadou présent dans la tête de souche sinon le cep peut ré-exprimer des symptômes d'esca-BDA l'année suivante. Par contre, il paraît **inutile de supprimer le bois mort brun et dur**, cela constituerait une perte de temps et une fragilisation plus importante du cep. Plus les symptômes d'esca-BDA sont légers, plus l'efficacité de la technique est bonne. Par contre, sur les ceps morts, ceux atteints de forme apoplectique, très chétifs et ceux atteints d'eutypiose, la technique ne fonctionne pas.



Comment cureter ?

☐ Ouvrir le cep

La première étape consiste à ouvrir le cep afin de **trouver l'amadou**. Cet amadou est souvent situé dans la tête du cep, sous le bois mort. Afin de le trouver, il faut **repérer les zones de bois mort et les grosses plaies de taille**. Il peut également se situer sur un côté du cep si des **déséquilibres importants** ont été effectués lors de la taille. Avant de commencer le tronçonnage, il est nécessaire de repérer les courants de sève fonctionnels. **Il faut éviter au maximum de couper ces courants de sève**. Pour ouvrir le cep, réaliser deux entailles dans le bois mort qui se rejoignent afin de **décrocher un morceau de bois**. Il ne faut pas hésiter à **ouvrir assez largement** afin de ne pas y passer trop de temps. Parfois, il est nécessaire d'attaquer une partie de bois vivant afin d'avoir une meilleure visibilité. Pour limiter l'impact du tronçonnage, il faut **toujours travailler dans l'axe du cep** et non perpendiculairement. Toute coupe perpendiculaire à l'axe du tronc augmente les risques de couper des flux de sève fonctionnels.

Dans la mesure du possible, il faut travailler au maximum avec le plat de la chaîne et éviter de forcer avec la pointe.



□ Eliminer l'amadou

Une fois le cep ouvert et l'amadou trouvé, il faut éliminer ce dernier en **raclant le bois carié** avec le côté de la chaîne de la tronçonneuse. Si la zone d'amadou paraît importante, ne pas hésiter à ouvrir le cep sur une plus grande longueur ou largeur.

Parfois, certains ceps curetés ré-expriment des symptômes l'année suivante. Dans ce cas, il est fort probable qu'une zone d'amadou ait été oubliée dans la tête ou l'un des bras. Un nouveau curetage peut être effectué.

□ Exemple

Ce cep formé de deux bras, exprime des symptômes d'esca. Des plaies de taille importantes ont été effectuées sur la tête du cep. Il est probable que l'amadou se situe sous ces plaies de taille. Le cep est donc ouvert en réalisant deux coupes de tronçonneuse en forme de V (traits en pointillé sur la photo ci-contre).

Autre cas de figure, sur les pieds fortement déséquilibrés lors de la taille, tout un côté du cep est mort. L'ouverture se fera alors de ce côté.

Revenons à notre exemple, une fois le cep ouvert et l'amadou trouvé, il est plus facile d'estimer l'étendue de cet amadou. Dans ce cas, l'amadou semble s'être développé principalement dans le bras de gauche (photos ci-dessous).

Pour ne pas perdre trop de temps, il est utile d'ouvrir plus largement ce bras. Ensuite, il ne reste plus qu'à cureter tout l'amadou en grattant avec le côté de la chaîne de la tronçonneuse.



Période de mise en oeuvre et entretien des ceps

□ Curetage en période hivernale

A priori, le curetage peut être réalisé toute l'année. Cependant, la période hivernale est pratique : les fils sont baissés, le feuillage ne gêne pas... Dans ce cas, il faut marquer les ceps à cureter en septembre. Au moment de la taille, si l'aoûtement est très incomplet, il faut laisser peu d'yeux fructifères pour que le cep refasse des réserves l'année suivante, dans le cas contraire, une charge normale peut lui être attribuée.

Dans la plupart des cas, suite au curetage, le cep redémarre vigoureusement.

□ Curetage en période estivale

Plus un cep est cureté rapidement après l'apparition des symptômes, plus ceux-ci seront limités. Ainsi, la période idéale semble être l'été. Il est ainsi souvent possible de sauver la récolte et de permettre au cep d'aoûter correctement ce qui limite l'entretien. L'inconvénient de cette période est le manque de temps.

Quelques chiffres

Voici ci-dessous les résultats d'un essai mené par le SICAVAC depuis 2012. Plus de 600 ceps ont été curetés pour cet essai et 700 ceps servent de témoin. Les chiffres sont des pourcentages de ceps exprimant des symptômes d'esca-BDA.

	Esca 2014	Esca 2015
Témoin	16,1	14,2
Curetage	8,7	4,3

Vitesse de travail : 100 à 200 ceps par jour

Coût estimé : 2,5€/pied