

UFR Sciences
2, Bd Lavoisier
49045 ANGERS Cedex 01

AGROCAMPUS OUEST
65 rue de St Brieuc, CS 84 215, BP 35042 -
RENNES Cedex
Université de Rennes I
1, 2 rue du Thabor, CS 46510 - 35065 RENNES
Cedex

71 rue Edouard
Bourlaux, 33140
Villenave d'Ornon

Mémoire de Fin d'Etudes

**Master 2 Sciences Technologie Santé
Mention Biologie et Technologie du Végétal
Spécialité : Production et Technologie du Végétal (ProTeV)**

Parcours : I Productions Végétales Spécialisées / Option : IA

Année universitaire 2013-2014

**ÉTUDE DE L'EXPRESSION DES SYMPTÔMES
FOLAIRES D'ESCA ET CARACTERISATION DES
COMMUNAUTES FONGIQUES DES TISSUS LIGNEUX**

Par : Céline BENETREAU



Soutenu à Angers le : 12/09/14

AUTORISATION DE DIFFUSION EN LIGNE

ÉTUDIANT(E)

N° étudiant : 20081314 Email : celinebenetreau@gmail.com

Je soussigné(e) Céline Bénétreau être l'auteur du document intitulé « Etude de l'expression des symptômes foliaires d'esca et caractérisation des communautés fongiques des tissus ligneux » préparé sous la direction de Pascal Lecomte et soutenu 12 septembre 2014.

Je certifie la conformité de la version électronique déposée avec l'exemplaire imprimé remis au jury, certifie que les documents non libres de droits figurant dans mon mémoire seront signalés par mes soins et pourront être retirés de la version qui sera diffusée en ligne par le Service Commun de la Documentation de l'Université d'Angers. Agissant en l'absence de toute contrainte, et sachant que je dispose à tout moment d'un droit de retrait de mes travaux, j'autorise, sans limitation de temps, l'Université d'Angers à les diffuser sur internet dans les conditions suivantes :

- diffusion immédiate du document en texte intégral
- diffusion différée du document en texte intégral ; date de mise en ligne :
- n'autorise pas sa diffusion dans le cadre du protocole de l'Université d'Angers

À Angers, le 12 / 09 / 14 Signature :



JURY DE SOUTENANCE

- autorise la diffusion immédiate du document en texte intégral
OU
- autorise la diffusion différée du document en texte intégral ; à compter du :

- en libre-accès *OU* en accès restreint

- sous réserve de corrections

OU

- n'autorise pas sa diffusion dans le cadre du protocole de l'Université d'Angers

À Angers, le 12 / 09 : 14

Nom et Signature du maître de stage: LECOMTE

Nom et Signature du président de jury: TRAVIER

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT**M2 PROTeV****2013-2014**

Je, soussigné (e) :

Céline Bénétreau

déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour ce rapport, rédigé au cours de mon master 2 Production et Technologie du Végétal (ProTeV).

Je m'engage également à respecter les consignes données pour la rédaction de ce rapport.

A : Angers

Le : 12 / 09 / 14

Signature :



REMERCIEMENTS

Je remercie tous les membres de l'UMR SAVE de l'INRA de Bordeaux avec lesquels j'ai pu échanger et qui ont pu me faire part de leur expérience. Tout d'abord, je tiens à remercier mon maître de stage, Pascal Lecomte, notamment pour l'expérience de terrain qu'il m'a transmise ainsi que pour tous les conseils rédactionnels apportés au cours de la rédaction de mon rapport.

Je tiens également à remercier Emilie Bruez pour l'aide qu'elle m'a apportée pour la réalisation de mon essai en biologie moléculaire. Merci d'avoir pris le temps de me montrer les différents protocoles à suivre. Je la remercie également pour les conseils prodigués pour la rédaction de mon rapport.

Une dernière personne que je tiens aussi à remercier : Jessica Vallance, pour le passage de mes échantillons en SSCP, pour son aide pour le traitement des données ainsi que pour la rédaction de mon rapport.

Enfin, je remercie mes stagiaires : Damien pour son aide en microbiologie, Loïse et Anaïs pour leur aide notamment pour les notations. Merci aussi à Rana, Awatef, Amira, Georgina, Cindy, Eloïse, Isabelle, Lionel, Gwenaëlle, Jean, Barka et toutes les personnes que je n'ai pas cités par oubli involontaire, qui ont chacun à leur façon participé au bon déroulement de ce stage.

***Etude de l'expression des symptômes foliaires d'esca et
caractérisation des communautés fongiques des tissus
ligneux***

I – PRESENTATION DE LA STRUCTURE DE STAGE.....	1
II – INTRODUCTION.....	1
III - CONNAISSANCES ACTUELLES CONCERNANT LES MALADIES DE BOIS DE LA VIGNE.....	3
 3.1 – L'esca.....	3
3.1.1 - <i>Les symptômes foliaires associés à l'esca.....</i>	3
3.1.2 – <i>Les agents pathogènes associés à l'esca.....</i>	4
 3.2 – Le Black Dead Arm (BDA).....	5
3.2.1 – <i>Les symptômes foliaires associés au BDA.....</i>	6
3.2.2 – <i>Les agents pathogènes associés au BDA.....</i>	7
 3.3 – Présentation de la problématique Esca / BDA.....	8
IV – LES METHODES DE LUTTE.....	8
V – FACTEURS INFLUENCANT L'EXPRESSION DES SYMPTOMES.....	9
VI – PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS	10
VII – MATERIELS ET METHODES.....	11
 7.1 - Dispositif expérimental et suivis réalisés.....	11
 7.2 - Caractérisation de la microflore fongique par méthode cultivable.....	12
 7.3- Caractérisation des communautés fongiques et bactériennes par empreinte moléculaire.....	12
VIII – RESULTATS.....	14
 8.1 - Etude de l'évolution et caractérisation des symptômes d'esca.....	14
 8.2 - Caractérisation de la microflore fongique par méthode cultivable.....	16
 8.3 - Caractérisation de la microflore fongique et bactérienne par empreinte moléculaire.....	19
IX – DISCUSSION ET CONCLUSION.....	20
X – REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	23

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Organisation de l'UMR SAVE

Figure 2 : Forme apoplectique (A) et forme lente de l'esca sur cépage blanc (B). Photo de symptômes foliaires sur cépage noir (C) et sur cépage blanc (D) (Bénétreau, 2014)

Figure 3 : Nécoses sectorielles (A), centrales (B) et mixtes (C) associées à l'esca (Lecomte, 2013)

Figure 4 : Désordre vasculaire (bande brune) attribué à l'esca (Liminana, 2009)

Figure 5 : Forme apoplectique (A) et forme lente du BDA sur cépage noir (B). Photo de symptômes foliaires sur cépage noir (C) et sur cépage blanc (D) (Bénétreau, 2014)

Figure 6 : Photos de l'évolution de symptômes attribués au BDA en symptômes caractéristiques de l'esca (Darrieutort, 2012)

Figure 7 : Protocole expérimental pour la comparaison de la microflore fongique entre le bois apparemment fonctionnel (« bois sain ») et la lésion longitudinale (Photographie P. Lecomte)

Figure 8 : Hauteur des précipitations et températures enregistrées sur la période du 1er mai au 19 août 2014.

Figure 9 : Evolution de la situation sanitaire dans les parcelles de cépages sensibles (A) et tolérants (B)

Figure 10 : Courbes de régression obtenues à partir du nombre de ceps symptomatiques en fonction du temps

Figure 11 : Représentation de l'évolution des symptômes d'esca pour la parcelle de Sauvignon blanc de Villenave d'Ornon

Figure 12 : Symptômes typiques d'esca, variables selon le cultivar et la gravité (Bénétreau, 2014)

Figure 13 : Moyennes des proportions des champignons pathogènes et saprophytes isolés dans les plants de Cabernet franc (A) et les Sauvignon blanc (B)

Figure 14 : Moyennes des proportions des espèces de *Botryosphaeria* spp. isolées dans les plants de Cabernet franc (A) et les Sauvignon blanc (B)

Figure 15 : Valeurs des indices de Shannon (A) et de Simpson (B). Les histogrammes avec des lettres différentes sont significativement différents

Figure 16 : Courbes de raréfaction des plants de Cabernet franc (A) et de Sauvignon blanc (B)

Figure 17 : Moyennes des proportions des champignons pathogènes et saprophytes isolés dans les plants de Cabernet franc prélevés en 2013 (A) et en 2014 (B)

Figure 18 : Exemples de profils SSCP obtenus pour les communautés fongiques et bactériennes sur Sauvignon blanc

Figure 19 : Analyse en Composantes Principales des communautés fongiques en fonction des cépages (A) et des tissus (C), des communautés bactériennes en fonction des cépages (B) et des tissus (D)

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Caractéristiques des parcelles d'étude

Tableau II : Echelle de notations évaluant l'état sanitaire d'un cep et la sévérité des symptômes foliaires liés à l'esca

Tableau III : Amorces utilisées pour amplifier l'ADN fongique et bactérien

Tableau IV : Nombre de bûchettes infectées selon le cépage et le type de tissu

Tableau V : Principaux genres isolés dans les deux types de tissus pour les plants de Cabernet franc et Sauvignon blanc

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Représentation des stades phénologiques de la vigne selon le code Baggioini

Annexe 2 : Principaux genres de champignons isolés à partir des tissus ligneux des plants de Cabernets francs et Sauvignon blanc

Annexe 3 : Courbes de régression obtenues en 2013

I-PRESENTATION DE LA STRUCTURE DE STAGE

Créé en 1946, l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) est un établissement Public à caractère Scientifique et Technologique, placé sous la double tutelle des Ministres chargés respectivement de la recherche et de l'agriculture. Les objectifs généraux sont de promouvoir une agriculture et une agro-industrie performante, d'assurer au consommateur une alimentation de qualité et de préserver l'environnement rural.

A Bordeaux le centre de recherches INRA fait partie des nombreux partenaires scientifiques de l'ISVV (Institut des Sciences de la Vigne et du Vin). Ce dernier fédère l'ensemble des équipes d'Aquitaine travaillant dans le domaine de la recherche, de l'enseignement supérieur et du transfert de technologies pour construire l'excellence de l'univers viti-vinicole. Le Centre de Recherche de Bordeaux Aquitaine est l'un des 21 centres de recherches de l'INRA. Il emploie 560 personnes, dont 195 chercheurs, réparties sur 15 implantations en Aquitaine, pour une surface de 780 ha. Les enjeux économiques dans la région Aquitaine sont considérables. L'agrosystème vigne de Bordeaux représente un potentiel de production de 123 000 hectares sous la menace de nombreuses maladies envers lesquelles les viticulteurs ne disposent pas toujours de moyens de lutte efficaces.

Située à Villenave d'Ornon, sur le site de la Grande Ferrade, l'UMR SAVE « Santé et Agroécologie du Vignoble » est une unité mixte de recherche qui associe du personnel de l'INRA et des enseignants chercheurs de Bordeaux Sciences Agro, l'ensemble dirigé par un directeur de recherches, Denis Thiéry. Elle fait partie du département scientifique INRA Santé des Plantes et de l'Environnement (SPE). L'UMR SAVE (figure 1) développe des recherches principalement sur l'agrosystème viticole dans le but de comprendre les mécanismes sous-jacents à l'établissement et au développement des maladies et populations d'insectes nuisibles. La finalité appliquée des recherches de cette unité est de développer une protection intégrée et durable de la vigne.

Les principaux domaines de recherches de l'UMR SAVE sont le diagnostic et l'étiologie des maladies émergentes, la plasticité comportementale des ravageurs de la vigne, la biodiversité et la structure génétique des populations, l'épidémiologie des maladies de la vigne, ainsi que la protection intégrée du vignoble.

II-INTRODUCTION

Les maladies du bois de la vigne comprennent trois principales maladies de déprésissements chez les plants adultes : l'eutypiose, l'esca et les chancres à Botryosphaeriaceae (notamment le Black Dead Arm (BDA)). Une augmentation de l'incidence des maladies du bois de la vigne a été observée ces quinze dernières années à l'échelle mondiale (Urbez-Torrez *et al.*, 2006). En France, jusqu'à la fin des années 90, les déprésissements les plus couramment observés étaient l'eutypiose et l'esca, mais dans le courant des années 2000, une nouvelle maladie causée par des Botryosphaeriaceae, *i.e* *Botryosphaeria obtusa* et *Botryosphaeria dothidea*, a été identifiée (Larignon *et al.*, 2001).

UMR Santé et Agro-écologie du Vignoble

Direction

D.U. : D. Thiéry

D.U. Adjoints : P. Rey, **L. Delière**

Secrétariat / Gestion

Responsable : M.C. Medalin

Réponses des communautés et des populations aux changements de pratiques

- Ecologie des communautés de micro-organismes et d'insectes
- Ecologie du paysage
- Evolution des traits de vie
- Invasion biologique

Dynamique des interactions biotiques

- Stimulation de défense des plantes
- Résistance ontogénique, architecture
- Génétique des interactions plante-pathogène
- Système immunitaire des insectes

Conception et évaluation de systèmes viticoles innovants

- Outils d'aide à la décision
- Méthodes de protection
- Lutte biologique
- Evaluation de systèmes de culture

Axes de Recherche

Biologie Moléculaire

Biochimie

Microbiologie

Entomologie

Expérimentation au champ

Agent Chargé de Prévention

Pôles de Compétences Techniques

Figure 1 : Organisation de l'UMR SAVE

Ces maladies de déprérissement engendrent des pertes économiques importantes et sont véritablement au cœur des préoccupations des viticulteurs. En France, toutes les régions viticoles sont touchées par les maladies du bois (Grosman and Doublet 2012, Bruez *et al.*, 2013). En 2003, un observatoire a été mis en place pour suivre l'évolution de ces maladies et identifier les caractéristiques parcellaires pouvant influencer l'expression des symptômes. L'impact économique lié à ces maladies de déprérissement est important. La perte moyenne de l'outil de production peut varier de 3 à 20 % selon les situations parcellaires.

Dans le cadre de cette étude, seul l'esca, l'une de ces maladies de déprérissement a été étudiée. Celle-ci est associée à des complexes de champignons présents dans des nécroses internes du bois. En été, cette maladie s'externalise par l'expression de symptômes foliaires affectant la végétation des céps. Cette maladie se présente classiquement sous deux formes : (i) une forme brutale dite apoplectique pouvant provoquer le déprérissement d'un cep en quelques heures, et (ii) une forme lente caractérisée par une décoloration et un dessèchement des feuilles. En France, une autre maladie a été décrite comme présentant des symptômes foliaires très voisins de l'esca et une anomalie vasculaire sous l'écorce. Ce symptôme foliaire a été attribué au BDA, mais un débat existe toujours sur le fait que le BDA serait une certaine forme de l'esca.

L'utilisation de l'arsénite de sodium permettait le contrôle de la maladie. Mais ce produit a été interdit en raison de sa toxicité pour l'homme et pour l'environnement en 2001. Aujourd'hui, aucune méthode de lutte, chimique ou biologique, ne remplace l'arsénite de sodium. Cette problématique est actuellement l'un des sujets de recherche majeur de la filière viti-vinicole.

L'intérêt de cette étude est d'avoir une meilleure compréhension de la dynamique et des formes d'expression des symptômes foliaires, et de pouvoir caractériser les agents biologiques impliqués dans l'expression de cette maladie. Dans une première partie, l'objectif de cette étude est de présenter les connaissances actuelles concernant l'Esca et BDA, *via* des études et des descriptions de symptômes, par l'identification des agents pathogènes, et enfin par les moyens de lutte mis en place.

La seconde partie portera sur le suivi de l'évolution des symptômes foliaires d'esca sur différents cépages de sensibilité variable, dans plusieurs vignobles représentant des situations pédologiques différentes. Des isolements seront réalisés à partir des dommages vasculaires associés à l'esca afin de mieux connaître la microflore à l'origine possible de ces symptômes. L'objectif principal de ce travail est de caractériser l'évolution des symptômes d'esca pour l'année 2014 et de comparer les résultats à ceux des deux années d'études précédentes.

Il s'agit également de modéliser la dynamique d'apparition des symptômes, d'étudier le lien entre l'expression des symptômes et le climat, et enfin de discuter sur l'implication des *Botryosphaeria* spp. dans la formation de la lésion longitudinale. Cette démarche rentre dans le cadre d'un programme de recherche de l'INRA (UMR SAVE) ayant pour but le suivi de l'expression, l'évolution, le développement et la dynamique des symptômes d'esca, ceci pour mieux préciser l'étiologie de cette maladie et de proposer une stratégie de lutte intégrée au vignoble.

III – CONNAISSANCES ACTUELLES CONCERNANT L’ESCA ET LE BDA

3.1 - L'esca

L'esca est la plus ancienne des maladies décrites sur la vigne puisqu'elle était connue des grecs et des romains (Dubos, 2002). Il s'agit d'une maladie complexe avec une expression très variable dans le temps (Surico *et al.*, 2006). Les symptômes apparaissent en été dès les premières chaleurs (Lecomte *et al.*, 2012) et se manifestent régulièrement durant toute la période végétative estivale. Ce syndrome, qui englobe une variété de symptômes dans le bois et sur les feuilles, affecte principalement la charpente de la souche et peut provoquer la mort du cep à plus ou moins long terme.

3.1.1 - Les symptômes associés à l'esca

Classiquement, les symptômes foliaires d'esca sont décrits sous deux formes : (i) une apoplectique qui se développe de façon rapide et foudroyante et (ii) une forme lente (figure 2). (i) Sous sa forme apoplectique, elle se déclare au milieu de l'été et se traduit par un dessèchement des ceps en quelques jours seulement. (ii) La forme lente est caractérisée par une décoloration particulière des feuilles qui prennent un aspect tigré (Mugnai *et al.*, 1999, Lecomte *et al.*, 2012). Ces symptômes foliaires se manifestent de façon erratique d'un cep à l'autre et d'une années à l'autre (Lecomte *et al.*, 2008).

Sur cépage noir (figure 2), les symptômes sont caractérisés par une pigmentation rouge vineuse du limbe. Les zones internervaires peuvent être desséchées, elles prennent alors un aspect vert sale, puis grisâtre (Lecomte *et al.*, 2013). Concernant les symptômes foliaires sur cépage blanc (figure 2), la coloration rouge est naturellement absente. L'altération de la couleur des feuilles peut commencer par des petites taches jaunes entre les nervures primaires qui s'élargissent progressivement et parfois se nécrosent en leur centre. Pendant la période de croissance, les tissus desséchés sont alors séparés de la partie non altérée par une bande jaune, il ne reste alors plus qu'une bande verte le long des nervures principales (Larignon, 2005). Dans cette étude, la maladie ne sera plus séparée en deux formes distinctes mais les symptômes seront classés selon un gradient de sévérité basé sur le nombre de sarments concernés et la gravité des altérations foliaires (Lecomte *et al.*, 2012).

Les symptômes sur fruits se traduisent soit par un retard dans leur maturation, soit par leur flétrissement (Larignon et Dubos, 1997). En Californie (Chiarappa, 1959) et en Italie (Graniti, 1960, Grasso, 1969), les fruits peuvent présenter des taches brunes violacées à leur surface. Ces symptômes sont en association ou non avec des symptômes foliaires (Chiarappa, 1959). Ce faciès, appelé « black measles » est parfois observé en France, plus particulièrement en Alsace mais ne présente aucun dommage économique.

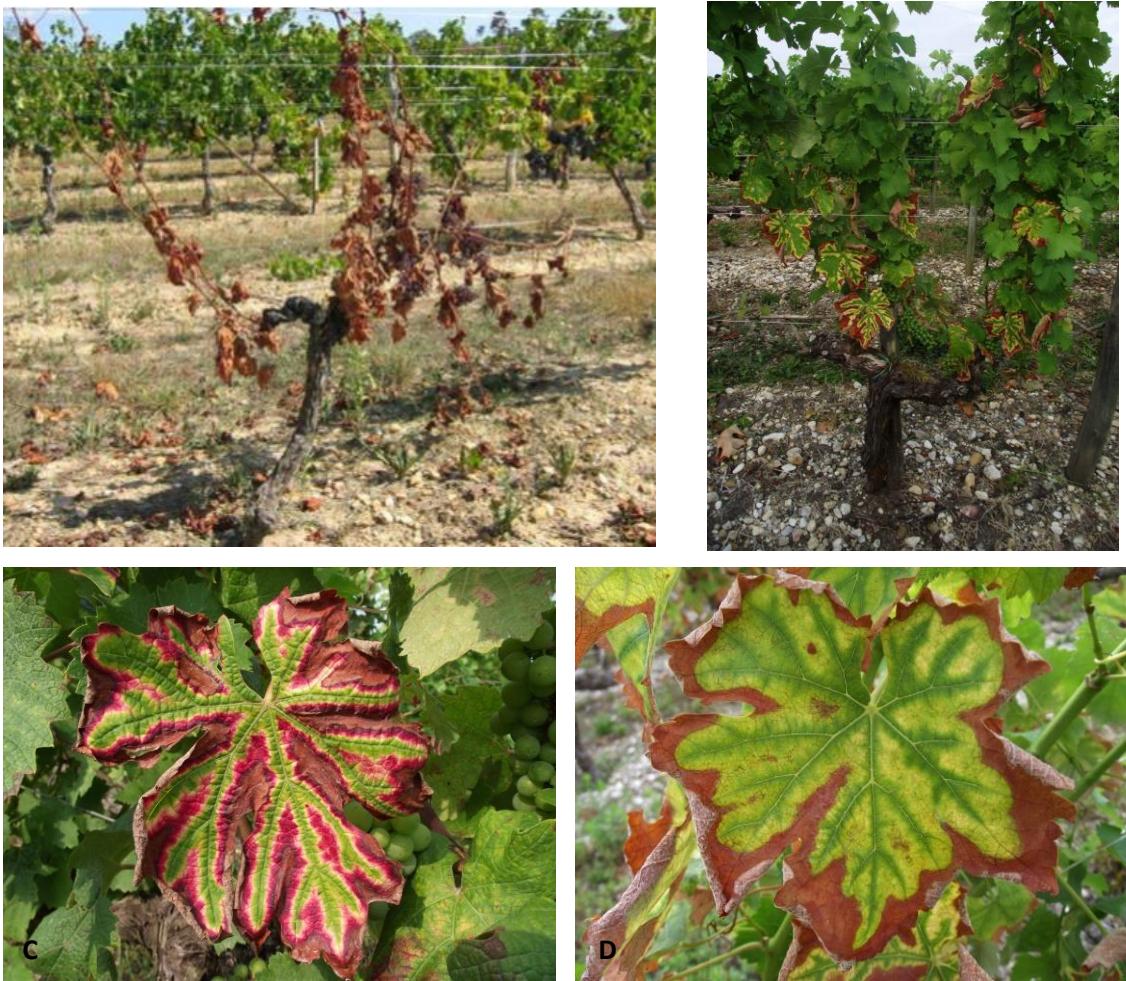


Figure 2 : Forme apoplectique (A) et forme lente de l'esca sur cépage blanc (B). Photo de symptômes foliaires sur cépage noir (C) et sur cépage blanc (D) (Bénétreau, 2014)

L'esca est aussi un syndrome caractérisé par des nécroses internes du bois de couleur et d'aspect variable (Mugnai *et al.*, 1999). La dégradation du bois (Larignon, 2004) aboutit à la formation de nécroses sectorielles, centrales ou bien une combinaison des deux (figure 3). La nécrose sectorielle présente essentiellement deux zones : une zone brune à consistance dure qui délimite une zone tendre et claire. La nécrose centrale est souvent constituée de trois zones : une zone claire à consistance tendre, séparée d'une zone brun-rose à consistance dure par un liseré de couleur noire. Lorsque l'on observe ces deux types de nécroses simultanément, il s'agit d'une nécrose mixte (Larignon, 2004). La taille des nécroses internes est utile pour expliquer l'expression des symptômes foliaires. Cependant, il ne s'agit pas d'un facteur explicatif toujours suffisant (Calzarano and Di Marco, 2007).

Depuis 2012 (Lecomte *et al.*), un autre type de lésion dans le bois permet de caractériser l'esca. Il s'agit d'une altération longitudinale et superficielle située juste au-dessous de l'écorce et facilement visible en décollant l'écorce au niveau des assises génératrices (cambiums). Cette lésion de couleur jaune-orangée, lorsqu'elle est très récente (au début de sa formation), a un aspect semblable à celui de tissus fraîchement exposés à l'air libre (figure 4). Ce symptôme est présent dès que des zones desséchées apparaissent au niveau du limbe des feuilles portées par des sarments malades. Le nombre et la taille de ce désordre vasculaire semblent corrélés avec la sévérité des symptômes foliaires (Lecomte *et al.*, 2014).

Ce symptôme très particulier a été attribué au BDA en 2001 bien qu'il fut auparavant décrit comme un symptôme d'esca (Arnaud and Arnaud, 1931; Branas, 1974; Ciferri, 1955). Une relation est ultérieurement possible avec les chancres à *Botryosphaeriaceae*, car par la suite, ce symptôme brunit et peut évoluer assez rapidement en chancre sectoriel dans lequel on peut isoler plusieurs espèces opportunistes dont des *Botryosphaeria* spp.. Mais au moment de son apparition dans le bois en été, ce symptôme est d'abord une conséquence de l'esca (Lecomte *et al.*, 2013).

3.1.2 – Agents pathogènes associés à l'esca

Actuellement les symptômes du bois associés à l'esca sont considérés comme appartenant aux ascomycètes et basidiomycètes (Larignon et Dubos, 1997). Plusieurs espèces fongiques distinctes ont été isolées selon les tissus ligneux colonisés : *Phaeomoniella chlamydospora* (*Pch*) et *Phaeoacremonium aleophilum* (*Pal*) dans la zone de décoloration brune centrale et/ou sectorielle et *Fomitiporia mediterranea* (*Fm*) et *Stereum hirsutum* (*Sh*) au niveau de la zone de décoloration brune où s'est formée une pourriture typique de l'esca (amadou).

Pch est un champignon endophyte dont les spores sont véhiculées par la sève. La dissémination se fait aussi de façon aérienne pendant toute l'année. Ce champignon naturellement présent dans le sol est également associé à la maladie de Pétri. Certaines étapes de l'élaboration en pépinière, telles que la stratification et la réhydratation, peuvent favoriser son développement (Edwards *et al.*, 2007). De plus, les blessures causées par les plaies de taille favorisent la pénétration du champignon (Lecomte *et al.*, 2013).



Figure 3 : Nécoses sectorielles (A), centrales (B) et mixtes (C) associées à l'esca (Lecomte, 2013)



Figure 4 : Désordre vasculaire (bande brune) attribué à l'esca (Liminana, 2009)

Quant à *Pal*, il s'agit d'un champignon qui se dissémine par voie aérienne pendant toute la période végétative et qui ne semble pas contaminer les plaies de taille pendant la période hivernale. *Pal* est rarement isolé dans les portes greffes et les plants greffés-soudés, cela implique que les bois sortis de pépinière n'ont pas participé à sa propagation. *Fm* et *Sh* sont des champignons à dissémination aérienne dont la pénétration s'effectue par les plaies de taille. Les sources d'inoculum sont contenues dans des carpophores situés sur les ceps (Lecomte, 2013). Ces deux champignons, *Pal* et *Pch* produisent divers métabolites toxiques de faibles poids moléculaires (Bertsch *et al.*, 2013) qui pourraient être à l'origine des symptômes, même si l'implication des toxines dans l'expression des symptômes d'esca n'a pas été démontrée de façon irréfutable à ce jour (Lecomte *et al.*, 2008).

Il convient cependant de noter qu'après l'isolement de ces champignons à partir du bois symptomatique et l'inoculation de nouvelles plantes, le quatrième postulat de Koch n'a été que partiellement vérifié. Cela se traduit par une reproduction partielle des symptômes foliaires et ligneux (Sparapano *et al.*, 2001).

3.2 - Le Black Dead Arm (BDA)

Le Black Dead Arm (BDA) a été décrit pour la première fois par Lehoczky en 1974 en Hongrie sur la base d'observations de chancres foncés dans le bois de vigne. Ces chancres ont été principalement associés à la présence de *Botryosphaeria* spp. dans les tissus du bois. Par la suite, Cristinzio (1978) puis Rovesti et Montermini (1987) ont identifié des lésions similaires en Italie et les ont associées à des symptômes de rougissement foliaire. Mais cette association avec ce type de symptôme foliaire n'a jamais été confirmé par la suite (Urbes-Torres, 2011). En France, ce n'est qu'en 1999 que ce type de déperissement a été signalé dans le vignoble bordelais par Larignon *et al.* (2001), puis observé dans la plupart des régions viticoles françaises. D'après Larignon *et al.* (2001), ce syndrome (comme l'esca) ne s'exprimerait pas par une seule forme unique. Il existerait plusieurs situations d'expressions de ce déperissement car les symptômes foliaires perçus en vignobles peuvent montrer de simples colorations rougeâtres ou des anomalies de couleurs, mais également des flétrissements ou des desséchements rapides.

L'origine des symptômes foliaires a été attribuée à l'action à distance des champignons du genre *Botryosphaeria*. Néanmoins, leur rôle dans l'expression de ce syndrome n'a pas encore été clairement élucidé et leur cycle biologique non plus. Aujourd'hui, à l'échelle internationale, toutes les pathologies permettant l'isolement des *Botryosphaeria* spp. sont appelées déperissements à *Botryosphaeriaceae*. Parmi les symptômes foliaires associés à ces déperissements ne figurent que des végétations affaiblies et des chloroses (mais pas de décolorations de feuilles) (Urbez-Torres, 2011). Plusieurs descriptions du BDA ont ainsi été réalisées ces quarante dernières années, montrant ainsi la complexité de ces pathologies, tant au niveau étiologique que symptomatique.

3.2.1 – Les symptômes associés au BDA

Les symptômes apparaissent à partir de fin mai ou mi-juin selon les vignobles et se manifestent pendant la période végétative en touchant les feuilles de la partie inférieure dans un premier temps. Il existe deux formes de BDA : (i) une forme sévère et (ii) une forme lente. (i) Une défoliation rapide des rameaux caractérise la forme sévère (figure 5). Ils peuvent se dessécher complètement ou partiellement en débutant par la partie apicale et donnant lieu à la formation d'un nouveau feuillage. Cette défoliation conduit rarement à la mort de la plante (Larignon *et al.*, 2001).

Concernant (ii) l'évolution lente, les symptômes sont différents selon les cépages. La symptomatologie des cépages noirs (figure 5) se traduit par des petites taches de couleur rouge en bordure des feuilles ou sur le limbe. Ces taches s'agrandissent, fusionnent pour former de grandes plages rougeâtres, laissant une bande verte le long des nervures principales. Ces zones nécrotiques ne laissent ensuite qu'un liseré de couleur rouge entre cette partie et celle de la feuille encore verte. Lorsque la maladie évolue, les derniers tissus restés verts jaunissent ainsi que les nervures principales. En périphérie, les tissus s'éclaircissent également puis deviennent jaunes (Larignon *et al.*, 2001).

Dans le cas des cépages blancs (figure 5), de petites taches jaunâtres apparaissent en surface du limbe ou en bordure de la feuille. Elles s'agrandissent, puis fusionnent pour donner de grandes plages nécrotiques. Lorsque les symptômes sont plus intenses, les feuilles présentent des zones perdant leur turgescence et devenant jaune-orangées. Ces zones s'étalent et fusionnent pour donner des zones entièrement nécrotiques ne laissant qu'une bande verte le long des nervures principales. Les tissus en bordure des zones nécrotiques jaunissent. Selon la gravité de la maladie, elle peut toucher les inflorescences ou les fruits conduisant à leur dessèchement (Larignon *et al.*, 2008).

Selon la gravité de la maladie ou la période à laquelle elle se manifeste, elle peut toucher les inflorescences ou les fruits. Le feuillage n'assurant qu'une très faible activité photosynthétique, les inflorescences ou plus tardivement les fruits peuvent se dessécher.

Le BDA est caractérisé par des nécroses externes du bois. Lorsque l'écorce est décollée, il est possible d'observer une bande brune de quelques centimètres, partant du rameau pour atteindre la soudure. La formation de cette bande brune dans sa phase précoce de développement, sous l'écorce, se déroulerait de façon discontinue, avec une alternance de zones de bois sain et de zones nécrosées (Lecomte *et al.*, 2005). En coupe transversale, cette bande brune est cernée par une zone de couleur claire, de quelques millimètres de profondeur, dans laquelle les vaisseaux sont obstrués. Cela se manifeste sur la partie herbacée par une intensité différentielle des symptômes (forme lente ou sévère). Ces bandes brunes sont liées le plus souvent à des nécroses sectorielles de couleur grises (Larignon *et al.*, 2001).

Ce symptôme très particulier a été attribué au BDA en 2001 bien qu'il fut auparavant décrit comme un symptôme d'esca (Arnaud et Arnaud, 1931; Branas, 1974; Ciferri, 1955). Une relation est ultérieurement possible avec les chancres à *Botryosphaeriaceae*, car par la suite ce symptôme brunit et peut évoluer assez rapidement en chancre sectoriel dans lequel on peut isoler plusieurs espèces opportunistes dont des *Botryosphaeria* spp. Mais au moment de son apparition dans le bois en été, ce symptôme est d'abord une conséquence de l'esca (Lecomte *et al.*, 2013).



Figure 5 : Forme apoplectique (A) et forme lente du BDA sur cépage noir (B). Photo de symptômes foliaires sur cépage noir (C) et sur cépage blanc (D) (Bénétreau, 2014)

3.2.2 – Agents pathogènes associés au BDA

Le BDA est également nommé dépérissement à *Botryosphaeria* spp. Ces dépérissements sont connus chez de nombreuses espèces ligneuses sous le nom de « chancres à *Botryosphaeria* » ou « Bot cancer ». Les *Botryosphaeria* spp., sont capables de coloniser une gamme de végétaux ligneux relativement large, chez lesquels ils peuvent se comporter de manière endophytique, saprophytique, ou bien pathogénique. Pour cette raison, la pathogénicité et l'épidémiologie des espèces de la famille des Botryosphaeriaceae ont longtemps été sujettes à de nombreuses incompréhensions (Larignon *et al.*, 2001).

Les espèces les plus fréquemment rencontrées sont : *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum* et *Diplodia mutila*. Des observations du BDA dans les vignobles français ont permis de montrer l'implication de certaines espèces de champignons pour le BDA. Les principales études ont porté sur *B. obtusa* qui est l'espèce majoritairement rencontrée en France. Il s'agit d'un champignon à dissémination aérienne. Les spores sont plus particulièrement disséminées pendant la période végétative de la vigne.

Les pics de dissémination correspondent toujours aux périodes pluvieuses. Les sources d'inoculum sont localisées soit sur le cep (tronc, bras, plaies de taille), soit sur les bois de taille laissés au sol. Il s'agit d'un parasite de blessure très efficient au printemps.

En ce qui concerne leur toxicité, les champignons pathogènes associés au BDA produisent des composés hydrophiles de haut poids moléculaire aux propriétés toxiques. Dans une étude récente, Evidente *et al.* (2010), ont identifié par spectrophotométrie trois métabolites produits par les champignons associés au BDA. De même que pour l'esca, l'implication des toxines dans l'expression des symptômes foliaires est suggérée par plusieurs scientifiques mais ce processus n'a pas été démontré de façon irréfutable à ce jour. Une autre question consiste donc à se demander si ces toxines seraient également responsables de l'anomalie observée dans le bois externe (Lecomte *et al.*, 2012).

Les isolements réalisés par Larignon *et al.* en 2001 dans les tissus des lésions brunes orangées ont révélé la présence de champignons appartenant au genre *Botryosphaeria*. Néanmoins, des études plus récentes (Lecomte *et al.*, 2010) ont montré que, même s'ils sont souvent parmi les principaux coloniseurs de ces lésions, suivant les cas, les *Botryosphaeria* spp. ne sont pas toujours présents dans les tissus de la bande orangée ou leur fréquence n'est pas significativement supérieure à celle des tissus fonctionnels voisins ne présentant pas de lésions. Un travail important reste donc à mettre en œuvre pour comprendre le rôle exact des Botryosphaeriaceae dans la genèse et le développement de ce symptôme.

3.5 – Présentation de la problématique esca/BDA

Bien que l'esca soit probablement la plus ancienne des affections décrites sur la vigne puisqu'elle était connue des Grecs et des Romains (Dubos, 2002), il n'existait pas de description complète et universelle des symptômes de l'esca. La description du Black Dead Arm *sensu* Larignon est toujours controversée. Cependant, d'après plusieurs auteurs, l'esca est souvent décrit comme pouvant se manifester selon un panel de symptômes foliaires parmi lesquels l'aspect «tigré» est le plus typique (Mugnai *et al.*, 1999 ; Surico *et al.*, 2006). Larignon et Dubos écrivaient en 2001 qu'il n'est pas difficile de différencier le BDA de l'esca dans ses premiers stades. D'après ces auteurs, les symptômes de BDA apparaissent plus tôt en saison (début juin) alors que ceux de l'esca se manifestent à partir de la fin juin. Les feuilles atteintes de BDA ne présentent jamais de liserés jaunes.

Pour les cépages noirs, le rouge de la nécrose est plus foncé que celui de l'esca. De plus, au niveau du bois, la bande brune-orangée ne serait observée que dans le cas de ce dépérissement. Mais la plupart des observateurs de terrain ont depuis une décennie toujours éprouvé des difficultés à distinguer les deux syndromes, notamment quand l'un semble céder la place à l'autre. Aussi, l'observation simultanée des deux symptomatologies sur les mêmes ceps et souvent sur les mêmes feuilles a conduit progressivement les notateurs à ne plus dissocier ces deux faciès et à regrouper tous les symptômes en une classe unique, appelée « BDA-esca » (Fussler *et al.*, 2008). Cette confusion de symptômes est à l'origine d'une vaste enquête réalisée par l'INRA de Bordeaux entre 2003 et 2007. En effet, les chercheurs de l'INRA de l'UMR SAVE ont depuis montré que ces deux syndromes ne pouvaient être dissociés (Darrietort *et al.*, 2007 ; Lecomte *et al.*, 2012). Les symptômes foliaires attribuées au BDA constituent en réalité une phase transitoire vers les symptômes caractéristiques d'esca (figure 6) (Lecomte *et al.*, 2005, 2012) et s'apparentent à l'une des nombreuses possibilités de manifestation de cette pathologie (Surico *et al.*, 2006).

IV – Les méthodes de lutte

A l'heure actuelle, il n'existe aucune méthode de lutte spécifique dirigée contre les champignons associés à l'esca/BDA. La protection des plaies de taille ne semble pas très efficace vis-à-vis de l'Esca et l'arsénite de sodium était le seul produit d'action en apparence curative efficace sur le marché.

Plusieurs études ont utilisées des espèces mycoparasites du genre *Trichoderma*. Ces champignons possèdent en effet un pouvoir antagoniste vis-à-vis d'autres micro-organismes et peuvent jouer un rôle dans l'activation des mécanismes de défense des plantes (Caldéron *et al.*, 1993). Selon Hunt *et al.*, (2001), l'application de *Trichoderma* sur les plaies de taille réduit fortement la colonisation du bois par *Eutypa lata* (-85%). Di Marco (2003) a également montré que l'application d'une souche de *Trichoderma harzianum* sur les plaies de taille empêchait le développement de *Phaeomoniella chlamydospora*.



Figure 6 : Photos de l'évolution de symptômes attribués au BDA en symptômes caractéristiques de l'esca (Darrietort, 2012)

Un produit nommé Esquive, dont la matière active est le champignon *Trichoderma atroviride*, a reçu en France une homologation provisoire en 2009 pour la lutte préventive contre l'esca/BDA. Cependant les résultats obtenus à partir de l'application de *Trichoderma* au vignoble sont nettement moins probants que ceux obtenus en laboratoire et l'effet antagoniste ne s'exprime pas aussi fortement.

La difficulté de trouver des méthodes de substitution à l'arsénite de soude nécessite de maîtriser et de pratiquer les principes fondamentaux en matière de prophylaxie afin de réduire les sources de contamination. Au vignoble, outre la pratique d'une taille respectueuse de la physiologie du plant de vigne (Dal *et al.*, 2008), la prophylaxie consiste aussi à repérer les ceps exprimant les symptômes, puis éliminer le plus rapidement possible tous les bois morts représentant des réservoirs potentiels d'inoculum.

V – Facteurs influençant l'expression des symptômes

La difficulté de reproduction du quatrième postulat de Koch suggère l'intervention de facteurs abiotiques dans la phase d'expression des symptômes. Certains facteurs sont déjà connus pour expliquer la variabilité des symptômes observés entre différentes parcelles, tels que la sensibilité des cépages aux maladies du bois. Par exemple en Gironde, il est possible d'observer 5% de ceps improductifs sur une parcelle de cépage résistant (Merlot) contre 41% sur une parcelle de cépage sensible (Cabernet sauvignon) (Lecomte *et al.*, 2011).

Il existe également un effet sol, c'est-à-dire que les parcelles humides à fortes réserves utiles et riches en azote sont plus favorables à l'expression de la maladie que les sols pauvres à faible teneur en eau. L'âge des parcelles et la sensibilité variétale sont également des facteurs bien connus, mais il est possible de rencontrer des parcelles de même âge et de même variété avec une expression symptomatique très différente. Néanmoins, le sol, l'âge et le cépage ne permettent pas d'expliquer à eux seuls la variabilité de situations. Cela suggère l'influence d'autres facteurs comme : (i) le climat, (ii) les pratiques culturales, (iii) la nutrition azotée... Ainsi, de nombreuses hypothèses peuvent être émises au sujet de changements survenant au niveau des facteurs abiotiques. (i) Le réchauffement climatique et en particulier l'augmentation de la température pourrait induire une augmentation de l'activité de certains parasites (Lecomte *et al.*, 2012). De plus, les périodes de sécheresse et de canicule plus fréquentes lors de cette dernière décennie pourraient favoriser le développement des parasites latents dans le bois des plantes pérennes.

En ce qui concerne (ii) les pratiques culturales, avant la plantation, de nombreuses études ont souligné que l'itinéraire technique en pépinière influait sur la qualité de robustesse d'un plant lors de son implantation au vignoble. Lors de la plantation, une absence de rotation, une mauvaise préparation du sol, des plants mal entreposés ou mal préparés, une date de plantation tardive, un arrosage insuffisant contribuent au développement des champignons. Après la plantation, la surproduction, la qualité de la taille, la mécanisation et les systèmes de conduite simplifiés peuvent être impliqués dans l'expression des maladies.

(iii) La nutrition azotée semble également jouer un rôle non négligeable sur l'expression des symptômes (Goutouly, 2010). Une nutrition azotée importante favorise le métabolisme de croissance alors qu'une faible nutrition azotée active le métabolisme secondaire avec la production de composés phénoliques. Selon cet auteur, il existe une baisse des capacités de résistance de la vigne face aux maladies de déprérissement lorsque les conditions climatiques et de nutrition azotée sont favorables à la croissance. Les symptômes foliaires augmentent alors et le complexe de pathogènes progresse plus rapidement. A l'inverse, lorsque la croissance est réduite, il se produit une diminution de l'expression des symptômes foliaires. Cela pourrait expliquer en partie, les fluctuations interannuelles dans l'expression des symptômes (Goutouly, 2010).

En conclusion, différentes hypothèses peuvent expliquer la progression des maladies du bois dans le monde. Il semble évident que le climat joue un rôle considérable sur l'expression des symptômes, cependant les mécanismes d'action ne sont pas encore bien élucidés. De plus, la prise en compte des pratiques culturelles associées au respect de la physiologie de la plante constituerait probablement une méthode de lutte tout à fait possible.

VI - PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

Les maladies de déprérissement du bois de la vigne nommées esca-BDA, constituent actuellement un « verrou technologique » pour les viticulteurs car ils ne disposent d'aucun moyen de lutte efficace contre ces pathologies. Elles sont aussi un « verrou scientifique » pour les chercheurs car de nombreuses interrogations subsistent sur les micro-organismes impliqués dans ces phénomènes de déprérissement.

Afin de lever, au moins en partie, cette indétermination, six parcelles d'étude ont été choisies selon certains critères tels que : la présence de symptômes d'esca, la sensibilité des cépages (Sauvignon Blanc, Cabernet Sauvignon / Cabernet Franc comparés à des tolérants tels que Merlot Noir et Malbec), l'âge des plants (entre 21 et 24 ans) permettant d'observer plus facilement la maladie. Le premier objectif de ces expérimentations a été de caractériser et comparer par deux approches complémentaires, la microflore colonisant les tissus ligneux de ceps présentant des symptômes d'esca. (i) Une approche pasteurienne (technique de microbiologie « classique ») par recherche de champignons après dépôt de fragments de bois sur milieu nutritif a tout d'abord été utilisée puis (ii) une technique d'empreinte moléculaire par Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP). Le second objectif de cette étude a été de (iii) modéliser la cinétique d'évolution de l'expression des symptômes foliaires d'esca.

(i) Le but de cette approche était de caractériser et de comparer la microflore fongique colonisant la bande brune et le bois sain de ceps présentant des symptômes d'esca. Deux cépages sensibles ont été étudiés : Cabernet franc et Sauvignon blanc.

(ii) L'approche par empreinte moléculaire a permis d'étudier la structure génétique des communautés fongiques et bactériennes présentes dans la bande brune et le bois sain selon les cépages.

(iii) Enfin, les études menées en 2012 (Diarra) et 2013 (Meziani) présentaient des profils d'expression des symptômes foliaires d'esca similaires à ceux obtenue en 2012 par Lecomte *et al.* Le suivi de l'évolution des symptômes de six parcelles différentes a permis d'étudier les relations entre la dynamique d'apparition des symptômes d'esca et son environnement.

VII – MATERIELS ET METHODES

7.1 – Dispositif expérimental et suivis réalisés

L'étude réalisée en 2014 concerne six parcelles situées sur quatre communes de Gironde et proches de Bordeaux : Cénac, Latresne, Pessac et Villenave d'Ornon. Des couples de cépages tolérants et sensibles ont été choisis sur les quatre sites d'étude afin de comparer l'expression de la maladie entre les cépages de sensibilité différente dans un même contexte environnemental (tableau I). L'expérimentation a été réalisée sur un total de 7 parcelles dont une ayant été arrachée (Cabernet franc de Cénac) et n'ayant servi qu'aux prélèvements destinés aux analyses microbiologiques. Les six autres parcelles ont permis la réalisation des études climatiques et symptomatiques.

Les données climatiques

Les données météorologiques du site de Villenave d'Ornon ont été collectées à partir de celles enregistrées sur le réseau Climatik de l'INRA (<https://intranet.inra.fr/climatik/do/climatik>) afin d'avoir une vision globale des variations climatiques sur la période de suivi des symptômes des six parcelles d'étude. Les paramètres utilisés sont : les températures moyennes et les hauteurs des précipitations.

L'état sanitaire

Avant l'apparition des premiers symptômes foliaires, chaque parcelle a fait l'objet au mois d'avril 2014, d'un relevé préalable des anomalies permettant d'évaluer l'impact des ceps atteints d'esca sur le potentiel de production. Différents états ont été observés : des ceps morts ou absents, des ceps avec un seul bras vivant, des ceps absents ou prélevés, des jeunes plants et des complaintes. Les données des deux années précédentes (2012 et 2013) ont été utilisées pour visualiser l'évolution du potentiel de production des parcelles. Le potentiel de production a été calculé en prenant le nombre de ceps affectés dans leur potentiel de production ramené au nombre total de ceps par parcelle.

Les notations en cours de végétation

Les notations ont consisté à évaluer le stade phénologique ainsi que le suivi de la maladie en cours de végétation sur les six parcelles d'étude. Deux notations ont été effectuées par semaine sur les 12 semaines de l'expérimentation, de début juin (début d'expression des symptômes) jusqu'à fin août 2014 (expression complète des symptômes). De ce fait, l'apparition de nouveaux symptômes a eu lieu dans un intervalle de 3 à 4 jours. Les notations ont été réalisées sur un total de 4619 ceps. Le système de notation a reposé sur le degré d'intensité d'expression des symptômes et sur leur aspect comme reporté dans le tableau II.

Tableau I : Caractéristiques des parcelles d'étude

Commune	Parcelle	Cépage	Analyses réalisées	Nombre de ceps/parcelle	Année de plantation	Sol	Système de taille
Cénac	Château Materre	Malbec (T)	N, C	673	1988	argilo-calcaire	Guyot double haut
		Cabernet franc (S)	M, BM	Arrachée en avril 2014			
Latresne	Château Lafitte	Cabernet Sauvignon (S)	N, C	820	1988	argilo-calcaire	guyot-double
Pessac	Château Pape Clément	Cabernet Sauvignon (S)	N, C	1126	1989	graves argileuses	Médocaine
		Merlot (T)	N, C	827	1989	graves argileuses	Médocaine
Villenave d'Ornon	Domaine INRA	Sauvignon Blanc (S)	N, M, BM, C	501	1991	graveleux	guyot-double
		Merlot (T)	N, C	672	1991	graveleux	guyot-double

T = tolérant, S = sensible, N = notation, M = microbiologie, BM = biologie moléculaire, C = climatologie

Tableau II: Echelle de notations évaluant l'état sanitaire d'un cep et la sévérité des symptômes foliaires liés à l'esca

Etat sanitaire d'un cep		Symptômes foliaires	
Abréviation	Signification	Abréviation	Signification
M	Mort	B	Stade BDA
BM	Bras mort	BE	Stade BDA-esca
U	Bras unique	Es	Stade esca
A	Absent	1	Symptôme léger sur un bras
CP	Complant	2	Symptôme léger deux bras
J	Jeune	3	Symptôme sévère sur un bras
P	Prélevé	4	Symptôme sévère deux bras
		5	Symptôme sévère sur deux bras et absence de production
		Apo	Bras ou cep entier apoplexié (forme apoplectique)
		f	Flétrissement de feuilles

Le code de Baggioolini (annexe 1) composé de plusieurs stades allant du débourrement (stade A) jusqu'à la véraison (stade M) a été utilisé pour évaluer les stades phénologiques.

Les notations ont permis de calculer le pourcentage d'expression des symptômes en rapportant le nombre de ceps symptomatiques sur le nombre total de ceps susceptibles d'exprimer l'esca. Les dates de notation ont été transformées en jours calendaires. Cette démarche a abouti à la modélisation par XL Stat de l'évolution des symptômes via une régression non linéaire basée sur l'équation logistique $Y = (\text{pr3} / (1 + \text{Expo}(-\text{pr1} - \text{pr2} * x)))$.

7.2 – Caractérisation de la microflore fongique par méthode cultivable

La caractérisation de la microflore fongique par méthode cultivable a été effectuée sur des ceps prélevés en 2014 ayant exprimés au moins une fois des symptômes foliaires d'esca au cours des deux dernières années. Des ceps prélevés et analysés en 2013 ont permis la réalisation d'une comparaison entre des bandes brune d'âge différent. En 2014, vingt plants de Cabernet franc et 20 plants de Sauvignon blanc ont été analysés. Par cep, dix prélèvements ont été réalisés dans la bande brune et dix dans le bois sain voisin. L'étude a donc été effectuée sur un total de 800 prélèvements : 400 pour les plants de Cabernet franc et 400 pour les plants de Sauvignons blanc.

Chaque cep a été écorcé et 20 échantillons de bois (languettes de ± 2 cm) ont été prélevés et numérotés du haut du bras vers le bas du tronc : 10 dans les tissus de la bande brune et 10 dans les tissus du bois voisin apparemment sain. Ensuite, 15 bûchettes par zone ont été découpées, désinfectées par trempage pendant dix secondes dans un bain d'hypochlorite de calcium à 2% et séchées à l'aide d'un papier filtre (figure 7). Cinq bûchettes ont ensuite été déposées sur milieu malt-agar ($15/20\text{g.l}^{-1}$), puis incubées à 22°C durant quatre semaines. Trois dates d'identification et de suivi des mycéliums ont été réalisées.

Un suivi de la croissance mycélienne a été réalisé durant les quatre semaines. Afin de comparer les espèces de *Botryosphaeria* spp. isolées dans le bois sain et la bande brune, celles-ci ont été systématiquement repiquées afin de pouvoir les identifier. Les résultats de dénombrement ont ensuite été analysés statistiquement selon le test de Student apparié à l'aide du package Rcmdr sous R (2.15.2).

7.3 – Caractérisation des communautés fongiques et bactériennes par empreinte moléculaire

L'étude a été effectuée sur 10 ceps symptomatiques, soit 5 plants de Cabernet franc et 5 plants de Sauvignon blanc. Pour chaque cep, 3 prélèvements de tissus ligneux apparemment sains et 3 prélèvements de bande brune ont été effectués, soit un total de 60 échantillons.

Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été réalisée à l'aide d'un kit commercial, l'Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitek). Avant extraction, les échantillons de bois ont été broyés dans de l'azote liquide à l'aide d'un broyeur à bille TissueLyserII (Qiagen). Environ 60 mg de biomasse ont été placés dans un tube Eppendorf contenant 400 μl de tampon de lyse P additionné de 20 μl de protéinase K. Les solutions de lyse ont été incubées 45 min à 65°C avant d'être transférées sur des colonnes filtrantes puis centrifugées 1 min à 12 000 rpm. Après élimination des colonnes filtrantes, 40 μl de RnaseA à 10 ng/ml ont été ajoutés au filtrat.

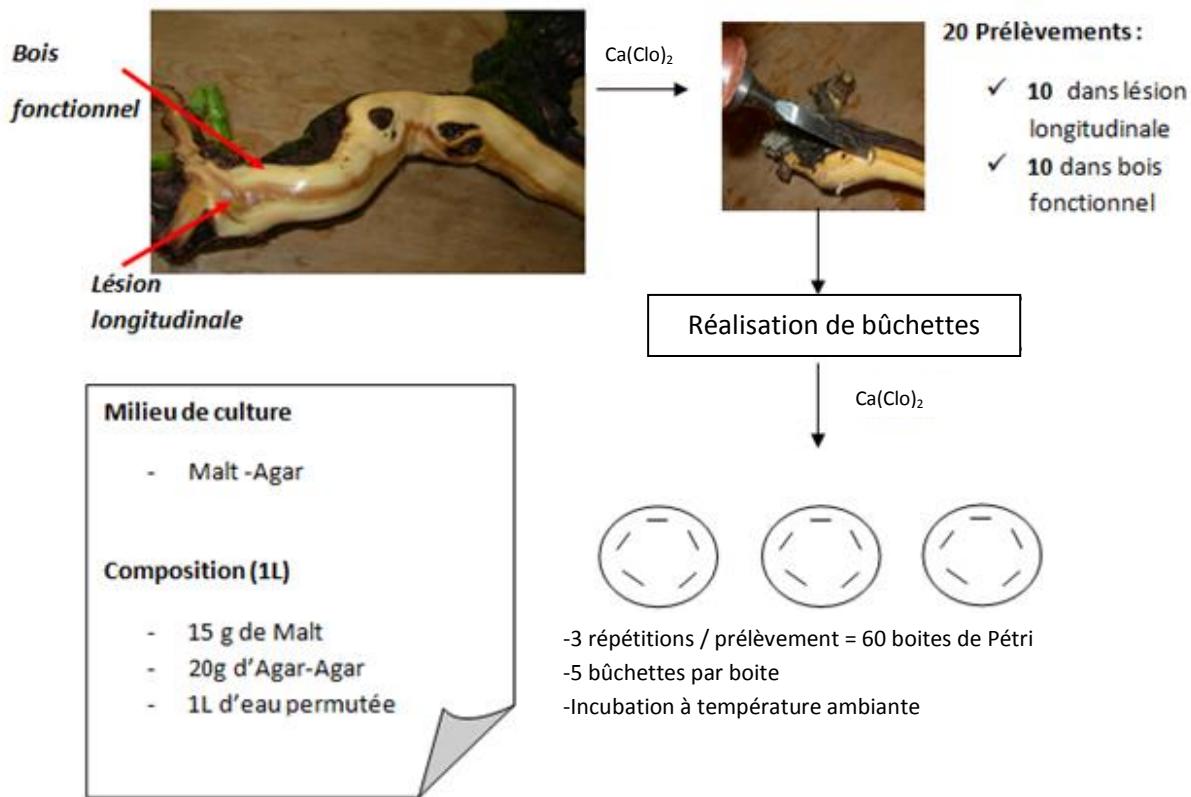


Figure 7 : Protocole expérimental pour la comparaison de la microflore fongique entre le bois apparemment fonctionnel (« bois sain ») et la lésion longitudinale (Photographie P. Lecomte)

Les tubes ont été vortexés brièvement et incubés 5 minutes à température ambiante. 200 µl de tampon de fixation P ont ensuite été ajoutés au filtrat et vortexés avant d'être transférés sur une nouvelle colonne filtrante. Après une incubation d'1 min à température ambiante, les tubes ont été centrifugés 1 min à 12 000 rpm. Les membranes filtrantes sur lesquelles sont fixés les ADN ont ensuite été transférées dans un nouveau tube collecteur avant de subir deux étapes de lavage. 550 µl de tampon de lavage I ont été ajoutés avant d'être centrifugés 1 min à 12 000 rpm. Le filtrat a été éliminé et 550 µl de tampon de lavage II ont été ajoutés puis centrifugés 1 min à 12 000 rpm. Cette étape de lavage avec le tampon II a été répétée une deuxième fois. Afin d'éliminer toutes traces d'éthanol (contenu dans le tampon de lavage II), les membranes ont été centrifugées à sec 3 min à 12000 rpm.

Les membranes ont ensuite été transférées dans un nouveau tube collecteur et 50 µl de tampon d'élution D préalablement chauffé à 65°C ont été déposés en leur centre. Après une incubation de 3 min à température ambiante et une centrifugation d'1 min à 10 000 rpm, les ADN ont été élus puis dosés au nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer, Thermoscientific, Labtech) avant d'être stockés à -20°C pour utilisation.

Amplification de l'ADN par PCR

Les différents jeux d'amorces utilisés pour étudier les populations bactériennes sont présentés dans le tableau III. Les réactions d'amplification par PCR ont été effectuées dans un thermocycleur Mastercycler Gradient (Eppendorf) dans un volume réactionnel de 25 µl contenant 1 µl d'ADN (10 ng/µl), 2.5 µl de tampon Pfu (10x), 1µl de dNTP (10 mM), 0.5µl de chaque amorce à 20 µM, 2.5 µl de BSA à 10 µg/µl (BioLabs), 0.5 µl de Pfu turbo (Agilent Technologies) et 16.5 µl d'eau distillée stérile. Les amplifications ont été réalisées à l'aide de la Pfu Turbo puisque cette Taq polymérase génère des fragments d'ADN à bouts francs et possède un taux d'erreurs faible (1.6×10^{-6} erreurs/base). De la BSA (Serum Albumine Bovine) a été incorporée aux mélanges réactionnels afin de supprimer l'action des inhibiteurs de PCR tels que les polysaccharides et les composés phénoliques extraits de la plante en même temps que les ADN. Le programme suivant a été utilisé pour les ADNs fongiques: dénaturation initiale de 2 min à 94°C suivie de 35 cycles de dénaturation (30 sec à 94 °C), de fixation des amorces (30 sec, 58°C), d'elongation (1 min à 72°C) et d'une elongation finale de 10 min à 72°C. Pour les bactéries le programme a consisté en une dénaturation initiale de 2 min à 94°C suivie de 25 cycles de dénaturation (45 sec à 94 °C), de fixation des amorces (30 sec, 54°C), d'elongation (1 min à 72°C) et d'une elongation finale de 10 min à 72°C.

Analyse par SSCP

Après vérification sur gel d'agarose, les produits d'amplification ont été préparés pour l'analyse SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) : 1 µl de produit PCR a été mélangé à 18.8 µl de formamide déionisé (Applied Biosystem) et 0.2 µl d'étalon interne (marqueur de taille GeneScan-400 ROX, Applied Biosystem). Un chauffage à 95°C pendant 5 minutes a été réalisé pour permettre la dénaturation des brins puis les échantillons ont été plongés dans la glace pendant 10 minutes afin d'éviter leur réappariement. Les brins d'ADN ainsi obtenus ont alors été séparés par électrophorèse capillaire et détectés grâce au marquage des amorces (6-FAM) (figure 8).

Tableau III : Amorces utilisées pour amplifier l'ADN fongique et bactérien

	Gène	Nom amores	Séquence 5'3'	Taille amplicon	T°C annealing
Champignons	mt LSU	ML1* ⁽¹⁾	6-FAM GTACTTTGCATAATGGGTAGC	253 bp	58°C
	rDNA	ML2* ⁽¹⁾	6-FAM TATGTTTCTAGAAAACCAGC		
Bactéries	16S	799f ⁽²⁾	AACMGATTAGATAACCCKG	\approx 350 bp	50°C
	rDNA	1115r* ⁽²⁾	6-FAM AGGGTTGCGCTCGTTG		

¹ White *et al.*, 1990 et ² Redford *et al.*, 2012. 6-FAM = 6-carboxyfluorescéine

L'électrophorèse a été réalisée avec un séquenceur automatique ABI PRISM 3130 (Genetic Analyzer 3130, Applied Biosystem) équipé de 4 capillaires de 36 cm, remplis de polymère composé de 5.6% de POP Conformational Analysis Polymer (Applied Biosystem), 10% de glycérol, de tampon EDTA (10x) et d'eau. Les conditions suivantes de migration ont été appliquées : 15 kV et 32°C. Les profils SSCP ainsi obtenus ont ensuite été alignés sous StatFingerprints puis analysés en Analyse en Composantes Principales à l'aide du logiciel R (2.15.2).

VIII – RESULTATS

8.1 – Etude de l'évolution et caractérisation des symptômes d'esca

Situation climatique

La figure 8 présente un relevé des données climatiques enregistrées du 1^{er} mai au 19 août 2014 (dernière date de notation). Une élévation des températures est enregistrée à partir du 140^{ème} jour calendaire (20 mai) jusqu'au 170^{ème} jour (19 juin), puis du 190^{ème} jour (9 juillet) au 196^{ème} jour (15 juillet). Chaque pic de température est précédé par une période de pluie.

Etat sanitaire des parcelles

Entre 2012 et 2014, les pourcentages de céps affectés dans leur potentiel de production ont augmenté respectivement de 18 à 27% pour les Cabernet Sauvignon de Latresne, de 29 à 56% pour les Carbernet Sauvignon de Pessac et de 27 à 53% pour les Sauvignon blanc de Villenave d'Ornon (figure 9).

Les états sanitaires des trois parcelles de cépages sensibles (Cabernet Sauvignon à Latresne et Pessac, Sauvignon blanc à Villenave d'Ornon) montrent une évolution croissante de la maladie de l'esca, ce qui augmente fortement l'improductivité du vignoble. Pour exemple, les plants de Sauvignon blanc sont des cépages très sensibles aux maladies du bois puisqu'il il y a une hausse de 10 à 15% de céps improductifs tous les ans. En comparaison, les cépages tolérants (Merlot et Malbec) présentent une évolution du pourcentage de céps affectés dans leur potentiel de production de moindre importance (de 0 à 3% en 3 ans).

Evolution des symptômes d'esca au vignoble

a) Evolution des symptômes à l'échelle de la parcelle

Les notations hebdomadaires réalisées au vignoble du 20 mai au 19 août 2014 ont montré une apparition progressive des symptômes d'esca (figure 10). La courbe de régression réalisée sur la parcelle de Malbec n'a été présentée qu'à partir du 190^{ème} jour calendaire en raison du faible nombre de relevés. Néanmoins, quelle que soit la parcelle, l'allure des courbes est restée la même. Il s'agissait de courbes sigmoïdales caractérisées par une première phase ascendante lente correspondant à l'apparition progressive des céps symptomatiques au mois de juin. Puis, la pente de la courbe s'est accentuée sévèrement, ce qui correspondait à l'augmentation rapide et régulière du nombre de céps symptomatiques en juillet. Enfin, la pente de la courbe s'est atténuée jusqu'à atteindre un plateau à la fin du mois d'août.

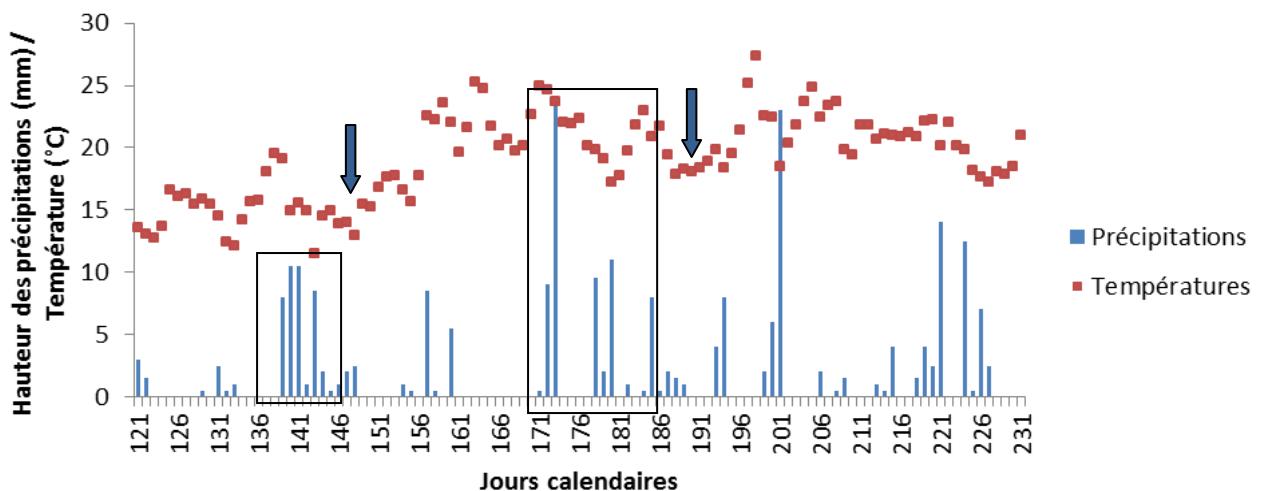


Figure 8 : Hauteur des précipitations et températures enregistrées sur la période du 1^{er} mai au 19 août 2014. Les flèches correspondent à l’élévation des températures. Les encadrés correspondent aux périodes pluvieuses.

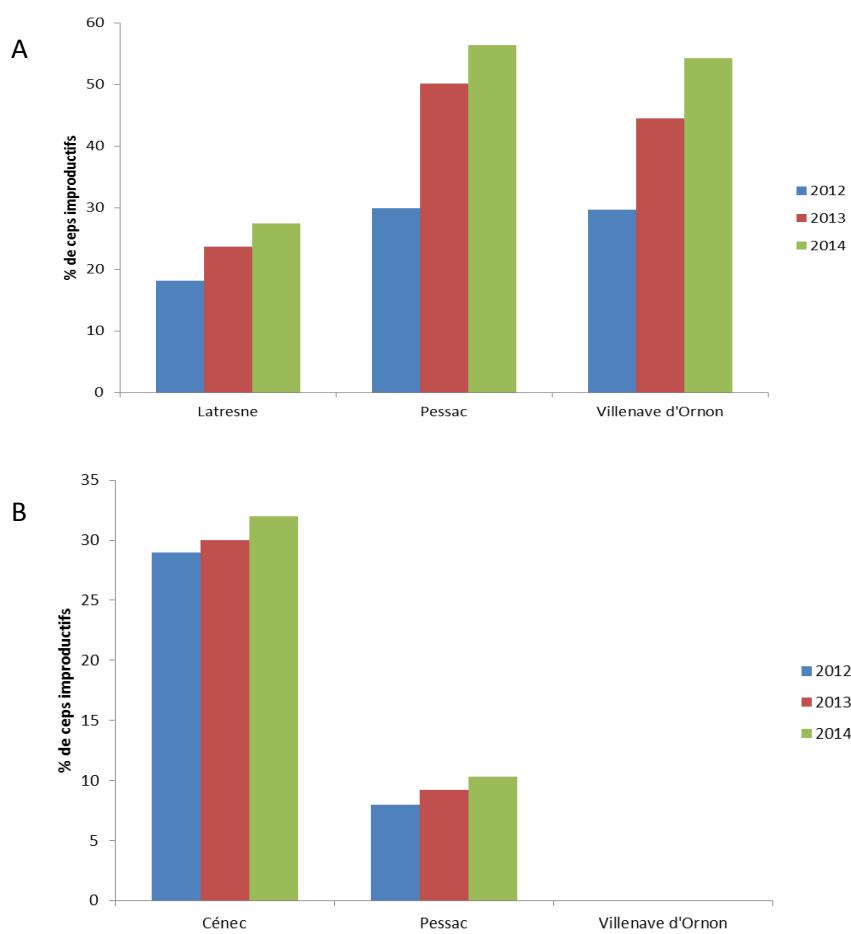
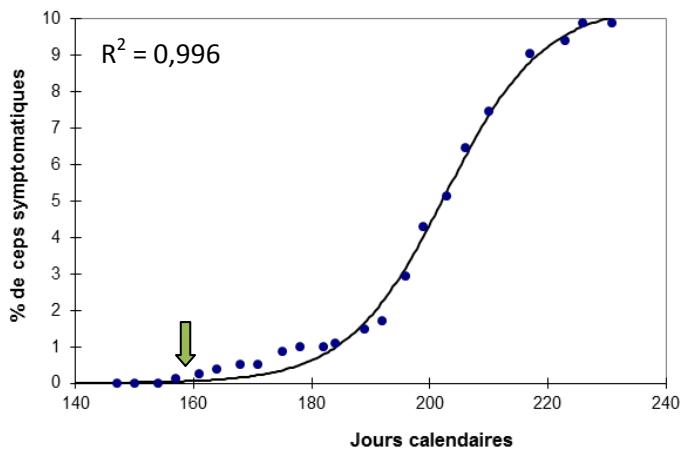
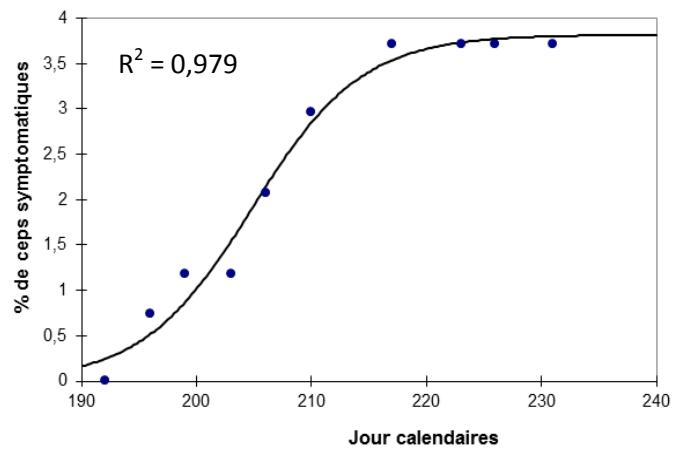


Figure 9 : Evolution de la situation sanitaire dans les parcelles de cépages sensibles (A) et tolérants (B)

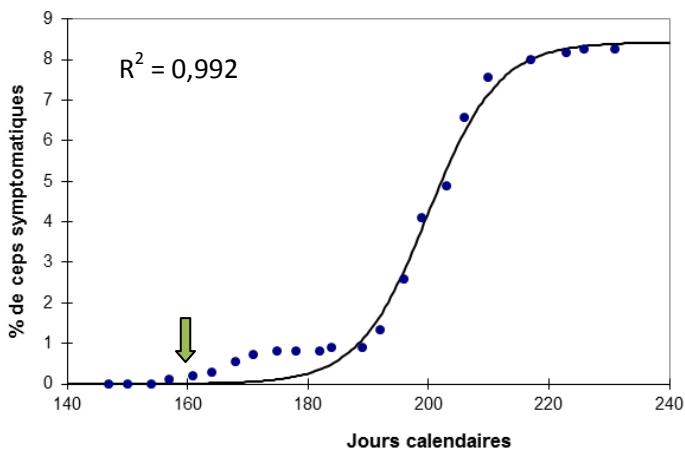
A Parcalle de Cabernet Sauvignon (Latresne)



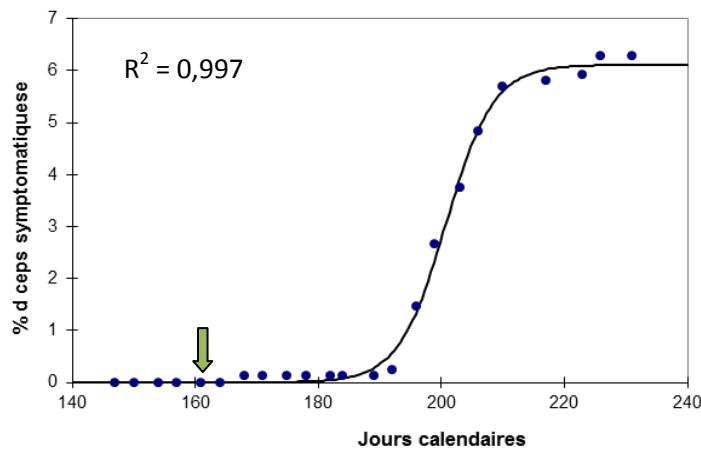
B Parcalle de Malbec (Cénac)



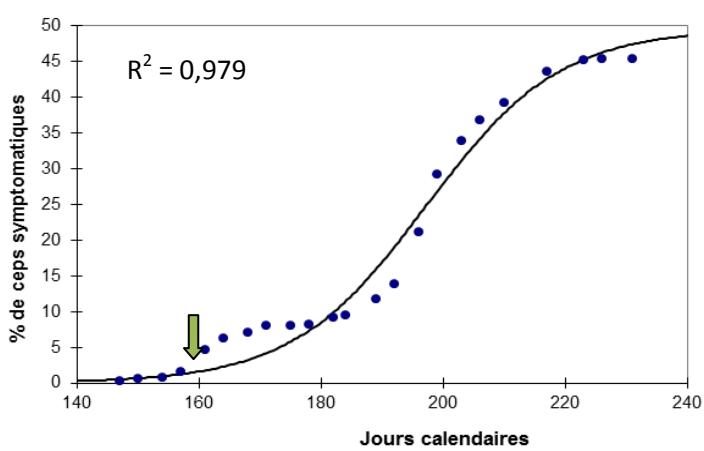
C Parcalle de Cabernet Sauvignon (Pessac)



D Parcalle de Merlot (Pessac)



E Parcalle de Sauvignon blanc (Villenave d'Ornon)



F Parcalle de Merlot (Villenave d'Ornon)

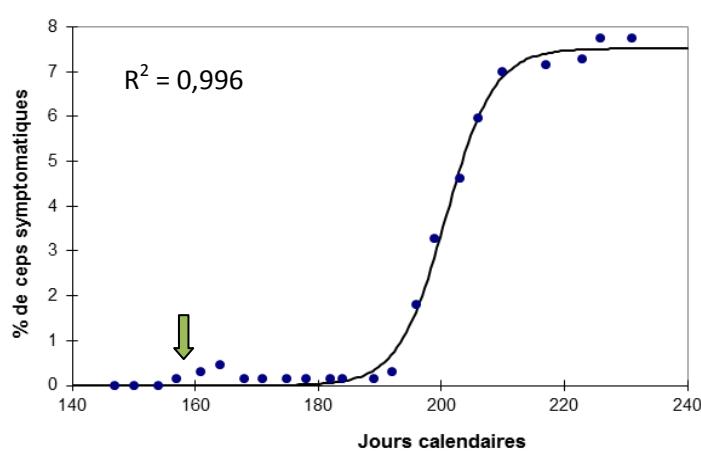


Figure 10 : Courbes de régression obtenues à partir du nombre de céps symptomatiques en fonction du temps. A, C et E = cépages sensibles et B, D et F = cépages tolérants, flèche verte = floraison

Les coefficients de détermination obtenus ont permis de montrer que l'apparition des symptômes au cours du temps suivait le modèle établi. Cependant, les cépages sensibles présentent plus d'écart à la courbe que les cépages tolérants. En effet, les valeurs situées en dessus de la courbe ont montré une accélération de la maladie au vignoble par un nombre de ceps symptomatiques croissant. Les valeurs en dessous de la courbe, quant à elles, ont suggéré un ralentissement de l'expression de la maladie.

Les symptômes observés dans les parcelles ont été très variables quantitativement. Il existe un gradient de sévérité entre le début d'expression de la maladie et son stade avancé. Ce gradient de sévérité est allé de quelques feuilles décolorées au cep entièrement « foudroyé », en passant par de nombreux stades intermédiaires. Ce gradient de sévérité est présenté en figure 11 pour la parcelle de Sauvignon blanc. Les mêmes résultats ont été obtenus à partir des cinq autres parcelles (données non montrées).

b) *Evolution des symptômes à l'échelle de la feuille*

Dans le cas de nos six parcelles suivies, les premiers symptômes d'esca se sont présentés par l'apparition de décoloration et/ou de dessèchement du limbe. Sur cépage noir, les symptômes étaient caractérisés par une pigmentation rouge vineuse du limbe et/ou des dessèchements internervaires, d'une teinte verte sale puis grisâtre (figure 12, A-E, J-K). Pour les cépages blancs, les décolorations sont vertes pâles à jaunes et semblent plus lentes à se dessiner que les dessèchements internervaires en début d'expression (figure 12, A-C, G-H). Ces résultats se révèlent être en adéquation avec ceux publiés en mai 2014 par Lecomte *et al.*. Comme cela a déjà été observé, les premiers symptômes peuvent donc être séparés en deux catégories selon leur degré de gravité.

(i) La première catégorie a été caractérisée par des feuilles qui ont chuté rapidement. Il s'agissait de feuilles gravement atteintes, présentant généralement de grandes zones desséchées et peu ou pas de pigmentation. La plupart d'entre elles sont tombées rapidement en quelques heures (défoliation). Dans les cas les plus sévères, les feuilles étaient totalement flétries (folletage), ce qui correspondaient à la forme apoplectique.

(ii) La seconde catégorie a concerné les feuilles qui ne chutaient pas et correspondait classiquement à la forme lente de la maladie. Au début, les feuilles ont présenté des décolorations rouges vineuses (cépage noir) ou vertes-jaunes (cépage blanc) avec ou sans zones desséchées. Ces zones décolorées ont évolué, des nouvelles décolorations sont apparues et ont abouti au symptôme « tigré » caractéristique de l'esca. Pour les cépages noirs, la décoloration rouge vineuse a laissé progressivement la place à des teintes rouge claire puis jaunes (figure 12, F). Les zones desséchées sont devenues orangées puis brunes lorsqu'elles sont complètement nécrosées. Pour les cépages blancs, l'évolution s'est traduite par une intensification de la coloration jaune, soit autour des zones desséchées, soit au niveau du limbe (figure 12, I).

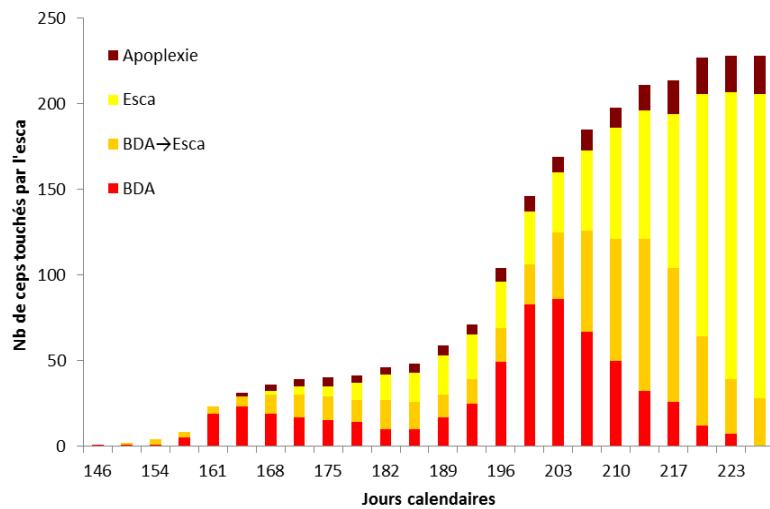


Figure 11 : Représentation de l'évolution des symptômes d'esca pour la parcelle de Sauvignon blanc de Villenave d'Ornon



Figure 12 : Symptômes typiques d'esca, variables selon le cultivar et la gravité. Légende : B,C, G-I = cépage blanc ; A, D-F, J-M = cépage noir ; A-C, J-K = symptômes âgés de quelques jours, D-I, L-M = symptômes âgés de plusieurs jours ou semaines (Bénétreau, 2014)

8.2 - Caractérisation de la microflore fongique par méthode cultivable

Populations fongiques se développant sur les bûchettes de bois

Lors de cette étude, 12 000 bûchettes ont été déposé sur milieu synthétique. Au moins un champignon a été isolé pour un tiers d'entre elles, soit 3558 bûchettes (29%) dont 1442 dans le bois sain et 2116 dans la bande brune. Pour les plants de Cabernet franc, au moins un champignon a été isolé dans 32% des bûchettes, soit 1905 bûchettes. Pour, les plants de Sauvignon blanc, au moins un champignon a été isolé dans 28% des bûchettes, soit 1653 bûchettes (tableau IV).

Dans le cas des plants de Cabernet franc, le pourcentage de bûchettes infectées est deux fois plus élevé dans la bande brune (40%) que dans le bois sain (23%). En ce qui concerne les plants de Sauvignon blanc, la différence est légèrement moins marquée (30% dans la bande brune et 25% dans le bois sain) (tableau 4). Les résultats du test ANOVA montrent qu'il existe une différence significative du nombre de bûchettes infectées dans la bande brune selon le cépage ($p\text{-value} = 0.0188$). Cependant ce test ne permet pas de montrer de différences significatives du nombre de bûchettes infectées dans le bois sain selon le cépage ($p\text{-value} = 0.639$). En fonction du cépage, le nombre de champignons isolé est différent dans le bois nécrosé.

Description des principaux genres fongiques isolés

Concernant l'identification des populations fongiques, cette étude a mis en évidence une grande diversité au sein des communautés fongiques du bois de la vigne (tableau V). De nombreux genres sont représentés (annexe 2), en particulier des Botryosphaeriaceae (champignons pathogènes associés à l'esca) et de nombreux saprophytes naturellement présents dans l'écorce. A l'exception d'*Eutypa lata*, les genres pathogènes sont majoritairement présents dans la bande brune. Le genre de champignon saprophyte le plus présent est *Penicillium* quel que soit le type de tissu. Les autres genres isolés sont répartis de manière très hétérogène dans la bande brune et le bois sain.

Répartition des populations de champignons pathogènes et saprophytes

Chez les plants de Cabernet franc, les moyennes du nombre d'isolats de *Botryosphaeria* spp. (10,2 isolat/plant), *Pch* (3,8 isolats/plant), et *Phomopsis* (8,85 isolats/plant) sont bien plus élevées dans la bande brune que dans le bois sain. Cependant les proportions de saprophytes étaient sensiblement les mêmes dans les deux types de tissus (15,15 isolats/plant dans le bois sain et 18,65 isolats/plant dans la bande brune) (figure 13). Pour les plants de Sauvignon blanc, la moyenne du nombre d'isolats de *Botryosphaeria* spp., de *Pch*, de *Phomopsis* et de saprophytes étaient relativement similaires dans la bande brune et dans le bois sain.

Les résultats d'un test ANOVA ont montré qu'il existait une différence significative concernant les proportions de *Botryosphaeria* spp. dans la bande brune et selon le cépage ($p\text{-value} = 0.0477$), ce qui n'est pas le cas dans le bois sain ($p\text{-value} > 1$). Les résultats d'un test ANOVA ont montré qu'il existait une différence significative concernant les proportions de *Pch* dans le bois sain et selon le cépage ($p\text{-value} = 0.00948$), cependant ce test n'a pas permis de montrer de différence significative pour la bande brune ($p\text{-value} = 0.111$).

Tableau IV : Nombre de bûchettes infectées selon le cépage et le type de tissu

	Cabernet franc	Sauvignon blanc	Total
Bois sain	686	756	1442
Bande brune	1219	897	2116
Total	1905	1653	3558

Tableau V : Principaux genres isolés dans les deux types de tissus pour les plants de Cabernet franc et Sauvignon blanc

	Sauvignon blanc		Cabernet franc	
	Bande (%)	Bois sain (%)	Bande (%)	Bois sain (%)
<i>Alternaria</i>	3,7	0,8	1,4	0,3
<i>Aspergillus</i>	4,5	2,5	1,4	5,6
<i>Aureobasidium</i>	1,0	0,1	0,1	0,6
Bactéries	13,4	22,4	3,5	9,6
<i>Botryosphaeria spp.</i>	10,2	7,0	15,8	5,4
<i>Chaetothyrium</i>	0,8	0,1	0,8	1,0
<i>Cladosporium</i>	0,7	3,2	0,4	2,6
<i>curvularia</i>	0,1	0,0	0,3	0,0
<i>Eutypa</i>	0,0	0,0	0,2	0,0
<i>Fusarium</i>	1,2	1,8	0,4	0,7
<i>Gliocladium</i>	0,0	0,0	0,1	0,0
Inconnus	16,5	14,9	23,7	26,9
<i>Lepiostoma</i>	3,4	5,0	6,0	9,4
Levures	0,6	2,2	2,5	6,0
<i>Microsporum</i>	0,0	0,0	0,6	0,0
<i>Penicillium</i>	23,8	26,0	15,8	20,9
<i>Pestalotia</i>	0,7	0,5	2,1	1,3
<i>Phaemoniella clamydospora</i>	2,8	0,3	6,4	4,2
<i>Phomopsis</i>	7,7	1,2	14,9	2,2
<i>Trichoderma</i>	8,4	10,6	0,5	0,6
<i>Verticillium</i>	0,3	0,5	1,4	0,0

En vert = genres protecteurs, en rouge = genres pathogènes, en noir = genres saprophytes

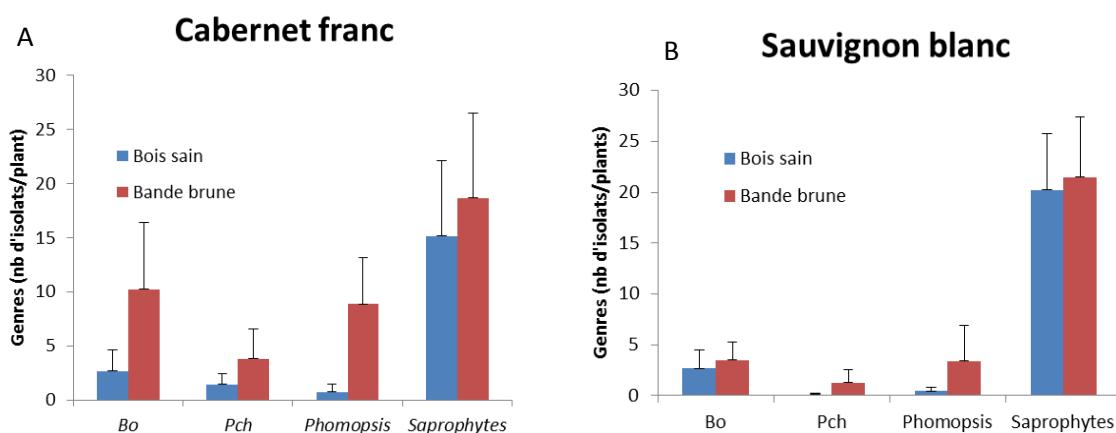


Figure 13 : Moyennes des proportions des champignons pathogènes et saprophytes isolés dans les plants de Cabernet franc (A) et les Sauvignon blanc (B). Les intervalles de confiance ont été calculés et indiqués avec des barres d'erreur. Bo = *Botryosphaeria spp.*, Pch = *Phaemoniella chlamydospora*

Les résultats d'un test ANOVA n'ont pas permis de montrer de différence significative pour les proportions de *Phomopsis* pour la bande brune (p-value = 0.062) et le bois sain (p-value = 0.458) selon le cépage. De même, il existait aucune différence significative pour les proportions de saprophytes dans le bois sain (p-value = 0.275) et la bande brune (p-value = 0.572) selon le cépage. Donc, il existe un effet cépage sur les proportions de *Botryosphaeria* spp. isolées dans la bande brune.

Pour les plants de Cabernet franc, une comparaison de moyennes via un test de Student apparié a montré qu'il existait une différence significative des proportions de *Botryosphaeria* spp. (p-value = 0.01145) et de *Phomopsis* (p-value = 0.0008441) mais pas pour les proportions de *Pch* (p-value = 0.1073) et de saprophytes (p-value = 0.2466) isolées dans la bande brune et le bois sain. Donc, les *Botryosphaeria* spp. et les *Phomopsis* colonisent préférentiellement la bande brune.

Pour les plants de Sauvignon blanc, une comparaison de moyennes via un test de Student apparié a montré qu'il n'existe pas de différence significative des proportions de *Botryosphaeria* spp. (p-value = 0.2333), de *Pch* (p-value = 0.1042), *Phomopsis* (p-value = 0.09068) et de saprophytes (p-value = 0.6389) isolées dans la bande brune et le bois sain. Donc, les proportions de pathogènes et de saprophytes dans les deux types de tissus ligneux sont restées globalement assez similaires. Les tests de comparaisons de moyennes ont montré que les plants de Cabernet franc étaient plus colonisés par les *Botryosphaeria* spp. que les plants de Sauvignon blanc.

Répartition des espèces de *Botryosphaeria* spp.

Chez les plants de Cabernet franc et de Sauvignon blanc, les moyennes du nombre d'isolats de *B. obtusa* (respectivement 5,4 et 2,9 isolats/plant) sont plus élevées dans la bande brune que dans le bois sain. Au niveau des proportions de *B.stevensii*, *B. parva* et *B. dothidea*, celles-ci sont relativement similaires dans les deux types de tissus et pour les deux cépages (figure 14).

Pour la bande brune et le bois sain, respectivement, les résultats d'un test ANOVA ont montré qu'il n'existe pas de différence significative concernant les proportions de *B. obtusa* (p-value = 0.22/0.236), *B. stevensii* (p-value = 0.195/0.324), *B. parva* (p-value = 0.389/0.657), et *B. dothidea* (p-value = 0.154/0.337). Donc, il n'existe pas d'effet cépage sur la répartition des proportions des espèces de *Botryosphaeria* dans les tissus ligneux.

Pour les plants de Cabernet franc, une comparaison de moyennes via un test de Student apparié a montré qu'il existait une différence significative des proportions de *B. obtusa* (p-value = 0.01954) mais pas pour les proportions *B. stevensii* (p-value = 0.1845), *B. parva* (p-value = 0.1845), et *B. dothidea* (p-value = 1) isolées dans la bande brune et le bois sain.

Pour les plants de Sauvignon blanc, une comparaison de moyennes via un test de Student apparié a montré qu'il n'existe pas de différence significative des proportions de *B. obtusa* (p-value = 0.3209) mais pas pour les proportions *B. stevensii* (p-value = 0.1625), *B. parva* (p-value = 0.1625), et *B. dothidea* (p-value = 0.3299) isolées dans la bande brune et le bois sain. Donc, seuls les plants de Cabernet franc ont été plus sensibles à la colonisation par *B. obtusa* dans la bande brune.

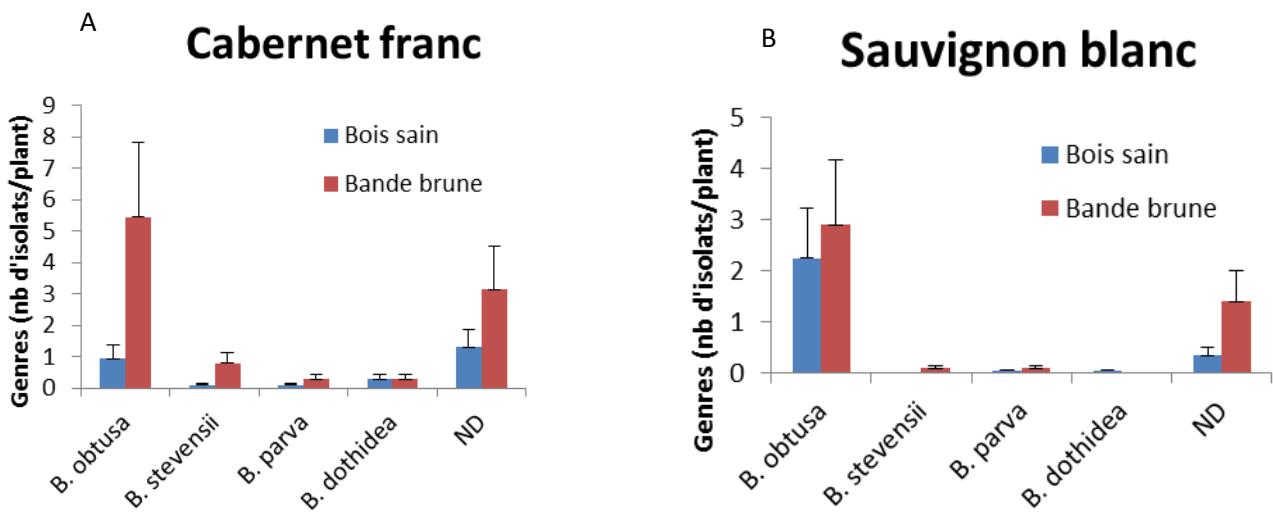


Figure 14 : Moyennes des proportions des des espèces de *Botryosphaeria* spp. isolées dans les plants de Cabernet franc (A) et les Sauvignon blanc (B). Les intervalles de confiance ont été calculés et indiqués avec des barres d'erreur

Etude de la biodiversité présente dans les tissus ligneux

La biodiversité présente dans le bois des céps a été estimée *via* les indices de Simpson et Shannon. L'indice de biodiversité de Shannon doit être associé à l'indice de Simpson. Ce dernier représente la probabilité que deux individus sélectionnés aléatoirement dans un échantillon donné soient de la même espèce. Cet indice évalue l'équitabilité d'une communauté, c'est-à-dire le degré de régularité de la répartition du nombre d'individus par espèce.

Pour le bois sain des plants de Cabernet franc, les indices de Shannon étaient compris entre 0,85 et 2,24 avec une moyenne de 1,53. Pour la bande brune, les indices variaient de 1,15 et 1,96 avec une moyenne de 1,60 (figure 15). Pour le bois sain des plants de Sauvignon blanc, les indices de Shannon étaient compris entre 0,41 et 2,06 avec une moyenne de 1,40. Pour la bande brune, les indices variaient de 0,23 et 2,03 avec une moyenne de 1,60 (figure 15).

Les résultats d'un test ANOVA ont montré qu'il n'existe pas de différence significative des valeurs des indices de Shannon pour la bande brune (*p*-value = 0.977) et pour le bois sain (*p*-value = 0.313) en fonction des cépages. La réalisation d'un test de Student apparié sur les valeurs des indices de Shannon n'a pas permis de montrer de différence significative de diversité des populations fongiques entre le bois sain et bande brune des plants de Cabernet franc (*p*-value = 0.4885) et de Sauvignon blanc (*p*-value = 0.0983).

Les résultats d'un test ANOVA ont montré qu'il n'existe pas de différence significative des valeurs des indices de Simpson pour la bande brune (*p*-value = 0.581) et pour le bois sain (*p*-value = 0.227) en fonction des cépages. La réalisation d'un test de Student apparié sur les valeurs des indices de Simpson n'a pas permis de montrer de différence significative de diversité des populations fongiques entre le bois sain et bande brune des plants de Cabernet franc (*p*-value = 0.4089) et de Sauvignon blanc (*p*-value = 0.2075).

Enfin, la réalisation de courbes de raréfaction a mis en évidence la qualité des échantillonnages. Les courbes obtenues pour les plants de Cabernet franc et de Sauvignon blanc (figure 16) n'ont pas atteint l'asymptote. Donc, l'échantillonnage n'était pas entièrement représentatif de la diversité fongique réelle présente dans les échantillons, ce qui tendait à sous-estimer la biodiversité réelle.

Etude de l'évolution de la microflore entre des bandes brunes récentes et des bandes brunes âgées de 6 mois sur plants de Cabernet franc

La récupération des données microbiologiques des plants de Cabernet franc présentant des symptômes récents d'esca prélevés en 2013 (Yacine, 2013) a permis la comparaison avec les données microbiologiques des plants de Cabernet franc présentant des symptômes sévères d'esca durant l'été 2013 et prélevés en mars 2014. La comparaison de la microflore d'une bande brune récente et d'une bande brune âgées de 6 mois a été réalisée.

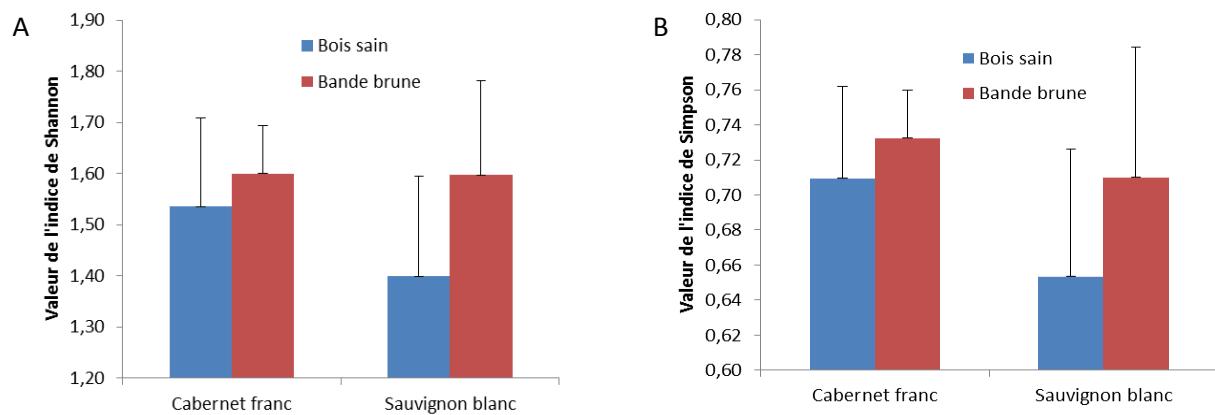


Figure 15 : Valeurs des indices de Shannon (A) et de Simpson (B). Les histogrammes avec des lettres différentes sont significativement différents. Les intervalles de confiance ont été calculés et indiqués avec des barres d'erreur

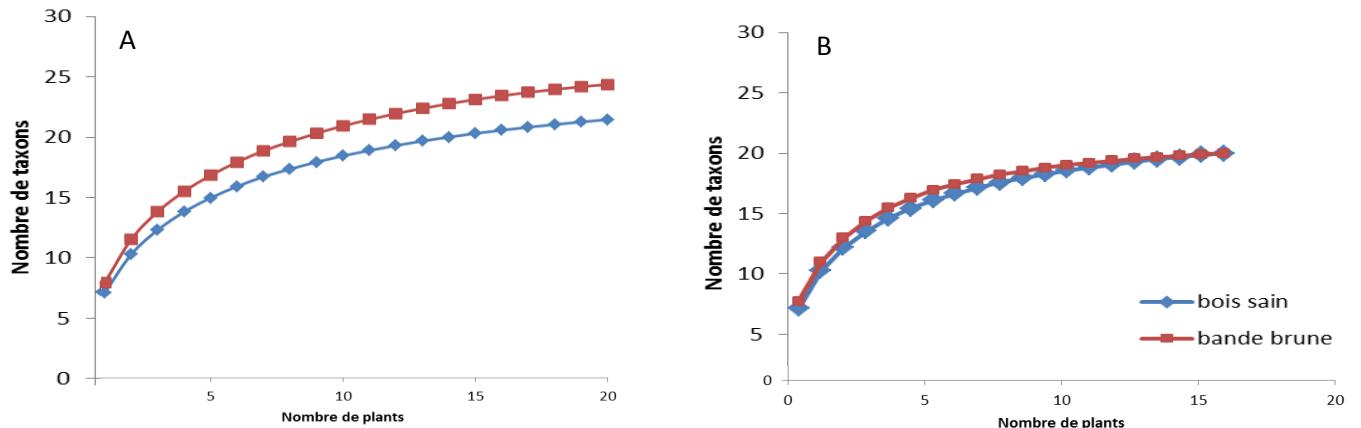


Figure 16 : Courbes de raréfaction des plants de Cabernet franc (A) et de Sauvignon blanc (B)

Pour les plants de Cabernet franc prélevés en 2013, 36% et 38% des bûchettes étaient infectées respectivement dans le bois sain et la bande brune. Dans le cas des plants de Cabernet franc prélevés en 2014, le pourcentage de bûchettes infectées était deux fois plus élevé dans la bande brune (40%) que dans le bois sain (23%). Les résultats d'un test ANOVA ont permis de montrer des différences significatives entre le nombre de bûchettes infectées dans la bande brune ($p\text{-value} = 1,17 \cdot 10^{-7}$) et dans le bois sain ($p\text{-value} = 1,03 \cdot 10^{-10}$) selon la date de prélèvement des ceps.

Chez les plants de Cabernet franc prélevés en 2014, les moyennes du nombre d'isolats de *Botryosphaeria* spp. (24,4 isolats/plant dans le bois sain contre 29,3 dans la bande brune), *Pch* (5,4 isolats/plant dans le bois sain contre 3,3 dans la bande brune), *Phomopsis* (0 isolat/plant dans le bois sain contre 0,4 dans la bande brune) et saprophytes (22,3 isolats/plant dans le bois sain contre 24,5 dans la bande brune) dans les deux types de tissus sont relativement similaires. Chez les plants de Cabernet franc prélevés en 2014, les moyennes du nombre d'isolats de *Botryosphaeria* spp. (10,2 isolats/plant), *Pch* (3,8 isolats /plant), et *Phomopsis* (8,85 isolats /plant) sont bien plus élevées dans la bande brune que dans le bois sain. Cependant les proportions de saprophytes étaient sensiblement les mêmes dans les deux types de tissus (15,15 isolats /plant dans le bois sain et 18,65 isolats /plant dans la bande brune) (figure 17).

Les résultats d'un test ANOVA sur les proportions de *Botryosphaeria* spp. ont permis de montrer des différences significatives entre le nombre de bûchettes infectées dans la bande brune ($p\text{-value} = 0.00533$) et dans le bois sain ($p\text{-value} = 0.000176$) selon la date de prélèvement des ceps. Les résultats d'un test ANOVA sur les proportions de *Pch* ont permis de mettre en évidence des différences significatives entre le nombre de bûchettes infectées dans le bois sain ($p\text{-value} = 0.00113$) selon la date de prélèvement des ceps, mais pas dans la bande brune ($p\text{-value} = 0.823$). Les résultats d'un test ANOVA sur les proportions de *Phomopsis* ont permis de montrer des différences significatives entre le nombre de bûchettes infectées dans la bande brune ($p\text{-value} = 0.0122$) selon la date de prélèvement des ceps, mais pas dans le bois sain ($p\text{-value} = 0.149$). Enfin, les résultats d'un test ANOVA sur les proportions de saprophytes n'ont pas permis de montrer des différences significatives entre le nombre de bûchettes infectées dans la bande brune ($p\text{-value} = 0.323$) et dans le bois sain ($p\text{-value} = 0.181$) selon la date de prélèvement des ceps. Donc seules les proportions de *Botryosphaeria* spp. et de *Phomopsis* ont augmenté de manière significative dans la bande brune six mois après sa formation.

8.3 - Caractérisation de la microflore fongique et bactérienne par empreinte moléculaire

Etude de la structure génétique des communautés fongiques et bactériennes

La structure des populations fongiques et bactériennes colonisant les plants de vigne a été analysée par SSCP en fonction d'une région codant pour l'ARN ribosomal 28S mitochondrial pour les champignons et de l'ARN ribosomal 16S pour les bactéries. Le nombre de pics ainsi que le décollement de la ligne de base observés sur chacun des profils correspondant aux différents échantillons étudiés, témoignent de la diversité et de l'abondance des populations fongiques et bactériennes (figure 18), sans toutefois en connaître la composition.

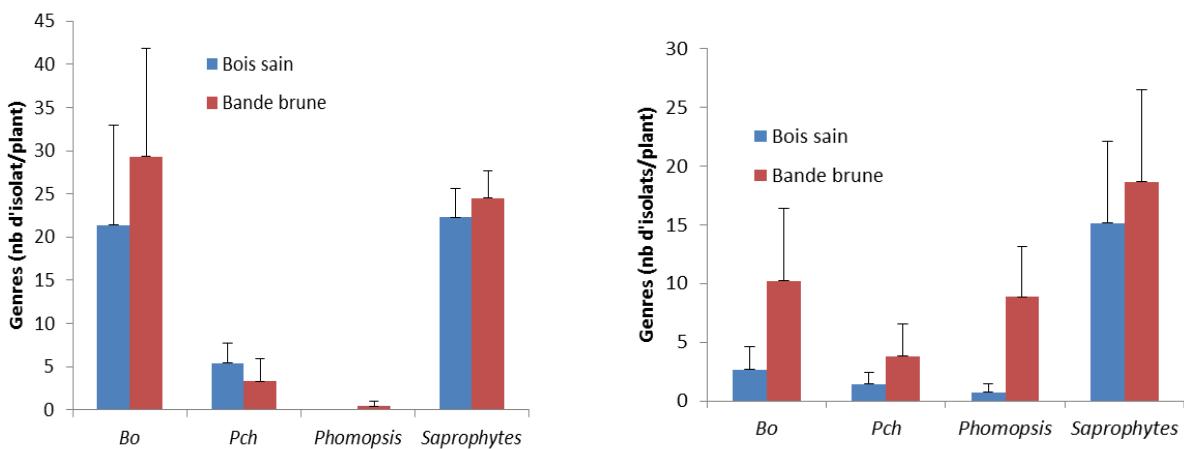


Figure 17 : Moyennes des proportions des champignons pathogènes et saprophytes isolés dans les plants de Cabernet franc prélevés en 2013 (A) et en 2014 (B). Les intervalles de confiance ont été calculés et indiqués avec des barres d'erreur. Bo = *Botryosphaeria spp.*, Pch = *Phaemoniella chlamydospora*

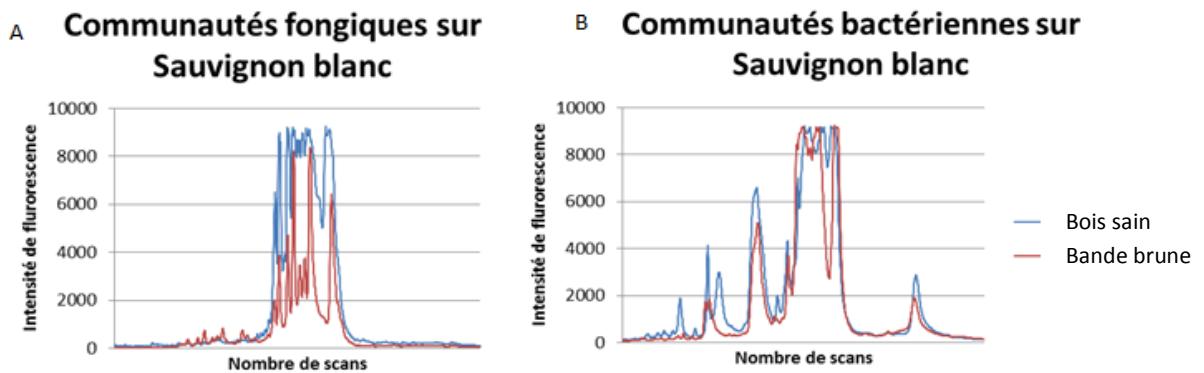


Figure 18 : Exemples de profils SSCP obtenus pour les communautés fongiques et bactériennes sur Sauvignon blanc

a) Analyse de l'effet cépage

La figure 19 représente la répartition des 60 échantillons sur le plan généré par l'ACP dont les deux premiers axes expliquent 50% de la variabilité totale. Les carrés correspondent aux centres de gravité des intervalles de confiance à 95% (représentés par les ellipses) de chaque groupe d'échantillons. Ils sont ici représentés en fonction des tissus ligneux et des cépages.

On note qu'en ce qui concerne les cépages, il existe une tendance pour la distinction de la microflore fongique entre Cabernet franc et Sauvignon blanc, car les ellipses dans leur représentation se recoupent en partie. Au niveau de la microflore bactérienne, celle-ci n'est pas statistiquement différente car les ellipses se recoupent, ce qui démontre l'homogénéité des échantillonnages effectués. Donc il existe un effet cépage sur la microflore fongique mais pas bactérienne.

b) Analyse de l'effet tissu

En ce qui concerne les tissus ligneux, il existe comme précédemment une tendance pour la distinction de la microflore fongique entre Cabernet franc et Sauvignon blanc, car les ellipses se recoupent en partie. Au niveau de la microflore bactérienne, celle-ci n'est pas statistiquement différente car les ellipses se recoupent, les échantillons étaient donc homogènes. Donc les espèces fongiques varient en fonction du type de tissu dans lequel elles sont isolées. La microflore fongique de la bande brune diffère en partie de celle du bois sain.

IX – DISCUSSION ET CONCLUSION

Etude de l'évolution de l'esca : de l'échelle parcellaire à l'échelle foliaire

Les maladies du bois de la vigne sont en recrudescence dans le vignoble français mais aussi européen et mondial. Très peu de vignobles ne sont pas touchés par ces maladies qui rendent le vignoble improductif. L'étude a montré que certains cépages étaient plus ou moins sensibles à l'esca et Bot canker mais globalement il y a une augmentation des maladies dans les parcelles.

Ainsi, les résultats sur la notation des symptômes foliaires dans les 6 parcelles ont mis en évidence l'effet de la variété dans la capacité de résistance aux maladies du bois. Cela a permis également de corrélérer la variabilité du nombre de ceps symptomatiques à la situation géographique et aux caractéristiques du sol. En effet, les besoins en température varient selon les cépages. Il pourrait peut-être y avoir un lien entre l'augmentation de la température sur une courte durée et l'apparition des symptômes. C'est ce qui a notamment été observé pour le cépage Sauvignon blanc dans la parcelle de Villenave d'Ornon. Aussi, le type de sol pourrait peut-être avoir un lien sur la réserve hydrique de la plante. Par exemple, pour les plants de Sauvignon blanc, un sol sableux est préférable. Il s'agit d'un sol perméable permettant un réchauffement plus rapide de racines et donc une entrée en production précoce. De plus, les courbes de régression modélisant la cinétique d'évolution des symptômes présentaient la même allure que les deux années précédentes (annexe 3). Cela confirme qu'il existe un modèle cohérent caractérisant la cinétique d'évolution de la maladie au vignoble.

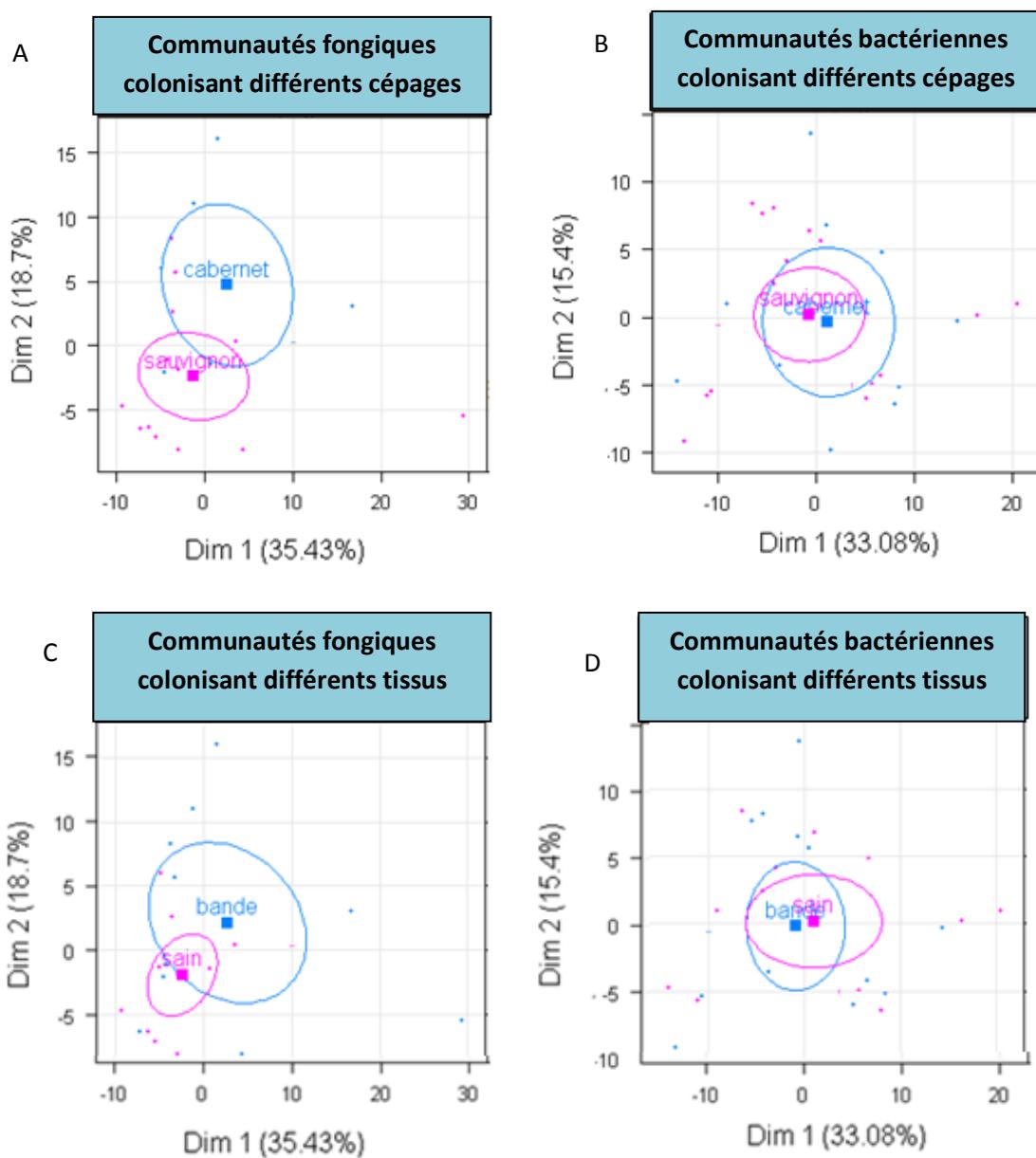


Figure 19 : Analyse en Composantes Principales des communautés fongiques en fonction des cépages (A) et des tissus (C), des communautés bactériennes en fonction des cépages (B) et des tissus (D). Les deux premiers axes (F1 et F2) ici notés Dim1 et Dim 2 expliquent 50% de la variabilité totale

D'autre part, nos notations montrent clairement que les effectifs de ceps symptomatiques chez les cépages résistants sont très faibles et pourraient être jugés insuffisants : pour les cépages résistants, il conviendrait d'augmenter les observations sur des effectifs plus grands de ceps susceptibles de montrer des symptômes.

A l'échelle du cep, le suivi de l'évolution des symptômes foliaires a permis de mettre en évidence un gradient de sévérité des symptômes foliaires. Les premiers symptômes sur feuilles correspondaient à la description faite du BDA, néanmoins la quasi-totalité de ces symptômes ont évolué vers une forme tigrée caractéristique de l'esca. Ces résultats laissent à penser que l'esca et le BDA ne sont en réalité que les formes évoluées ou non d'une seule et même maladie. D'un point de vue phénotypique, différents aspects tigrés caractéristiques de la couleur du cépage et de sa capacité de résistance face aux maladies du bois ont été observés.

Caractérisation de la microflore des tissus ligneux

L'identification et le rôle des micro-organismes colonisant le bois de la vigne atteint par l'esca sont actuellement au cœur de nombreuses thématiques de recherche ayant attiré aux maladies du bois. Afin d'apporter de nouveaux éléments à ce sujet, deux approches complémentaires ont été réalisées : une approche de microbiologie classique permettant de mettre en évidence les agents fongiques cultivables et une autre par empreinte moléculaire (SSCP) pour donner une vue plus exhaustive du microbiote.

Lors de la réalisation de l'expérimentation, les échantillons ont été prélevés sur plants de Cabernet franc et de Sauvignon blanc ayant été symptomatiques au moins une fois au cours de ces deux dernières années. L'expérimentation a permis de caractériser la microflore associée aux lésions longitudinales localisées dans le prolongement des symptômes foliaires. Les résultats des analyses de microbiologie ont montré que pour les deux cépages, une mycoflore diversifiée et abondante colonisait tous les ceps. De nombreux agents pathogènes et champignons saprophytes ont été retrouvés dans le bois sain et la bande brune des plants de Cabernet franc et de Sauvignon blanc. En effet, un tiers des bûchettes a été infecté par au moins un champignon. Néanmoins, il existe des variations du nombre de bûchettes infectées dans la bande brune selon le cépage. Les plants de Cabernet franc se révèleraient être plus sensibles à la colonisation fongique et bactérienne que les plants de Sauvignon blanc. La répétition de l'expérimentation permettrait de confirmer ce résultat.

De manière générale, des champignons pathogènes du genre *Botryosphaeria* spp., et en particulier l'espèce *Botryosphaeria obtusa*, ont été isolés dans les bandes brunes pour les deux cépages (Cabernet franc et Sauvignon blanc). *Phaeomoniella chlamydospora* est également fréquemment rencontré, ce qui correspond bien à ce qui est évoqué dans la littérature. *Phaeoacremonium aleophilum*, très souvent cité comme étant un des principaux pathogènes associés à l'esca, est absent du bois ayant été analysé. Cependant, en microbiologie classique, ce champignon croît difficilement sur un milieu synthétique. Cette étude a aussi permis de montrer la présence relativement importante de genre tel que *Lephiostoma*. Néanmoins, son implication éventuelle dans l'expression des symptômes d'esca reste à démontrer. Des champignons potentiellement bénéfiques ont également été isolés, tels que *Trichoderma* et *Fusarium*. Certaines souches de *Trichoderma* sont connues pour leur capacité à parasiter les champignons dégradateurs du bois (Lee *et al.*, 2012). Les indices permettent de montrer que le bois sain et la bande brune sont caractérisés par des communautés fongiques assez semblables en termes de diversité.

L'étude de l'évolution de la microflore fongique entre des plants prélevés à 6 mois d'intervalle, a démontré que les genres *Botryosphaeria* spp., connus pour leur implication dans le Bot canker (Urbez-Torrez, 2011), et *Phomopsis* sont plus abondants dans la bande brune plusieurs mois après sa formation. Cela tend à confirmer que même si les *Botryosphaeria* spp. et les *Phomopsis* ne sont pas les champignons majoritairement présents lors de la formation de la bande brune, il n'est pas exclu qu'avec le temps ce type de lésion devienne un chancre à *Botryosphaeria* spp. ou chancre à *Phomopsis*.

L'approche par microbiologie classique a permis d'isoler de nombreux champignons, cependant cette approche présente des limites : (i) elle caractérise uniquement la fraction cultivable des communautés microbiennes (0,1 à 10 % de la microflore tellurique), (ii) la croissance des micro-organismes est sélective, favorisant les espèces à croissance rapide et les plus adaptées aux conditions d'incubation (température, éléments nutritifs du milieu) et (iii) les résultats dépendent de l'état physiologique des agents microbiens qui peuvent être viables, viables mais non cultivables, en dormance... (Prosser, 2002 ; Kirk *et al.*, 2004 ; Nocker *et al.*, 2007). C'est pourquoi, par la suite, une méthode de caractérisation des structures génétiques des populations fongiques et bactériennes a été employée.

L'étude de la microflore fongique et bactérienne par approche moléculaire a permis de montrer qu'il existait des différences de composition de la microflore fongique entre cépages et entre tissus. Il y aurait donc une tendance à ce que les communautés fongiques soit particulières aux cépages et aux tissus (bande brune et bois sain). Les communautés bactériennes sont quant à elles très similaires quel que soit le cépage ou les tissus qu'elles colonisent. Pour affiner cette étude par approche moléculaire, il serait intéressant de pouvoir comparer les mêmes cépages mais à des saisons différentes, ou bien de pouvoir comparer avec d'autres cépages provenant d'autres régions.

En conclusion, la littérature rapporte que les maladies de dépérissement sont des systèmes complexes, qui suggèrent l'implication de plusieurs agents fongiques en combinaison avec d'autres facteurs abiotiques, i.e. la vigueur, le stress hydrique (Lecomte *et al.*, 2008). La présente étude a indiqué qu'une mycoflore complexe colonisait le bois sain et nécrosé des ceps et que les relations entre ces champignons mériteraient d'être approfondies. Le rôle d'autres micro-organismes, les bactéries, devra aussi être étudié. Les connaissances sur les populations de micro-organismes fongiques et bactériennes restent donc primordiales afin de trouver des méthodes de lutte efficaces contre l'esca-BDA. La poursuite des investigations en explorant non seulement les tissus nécrosés mais aussi le bois sain de ceps présentant des symptômes foliaires ou non peut se révéler une source d'informations importante. L'utilisation de méthodes moléculaires telles que la SSCP, mais également l'utilisation du pyro-séquençage permettrait d'identifier les champignons présents dans le bois qui ne peuvent pas se développer sur milieux synthétique.

L'étude menée a permis de montrer qu'il existe une évolution quantitative croissante des communautés fongiques et bactériennes colonisant la bande brune au cours du temps. Cela suggère fortement une relation entre la quantité de bois nécrosé et la réduction des flux de sève brute causé par la compétition pour l'eau entre les micro-organismes et le plant de vigne. Cette étude encourage à poursuivre les notations au vignoble afin de corrélérer les variations de la cinétique d'expression des symptômes aux facteurs abiotiques. La mise en place d'un système de mesure de la conduction hydrique pourrait être envisagée afin de mieux comprendre les différences physiologiques entre des plants exprimant des symptômes et de ceux n'en exprimant pas. Ces nouvelles pistes d'investigation ouvrent un large champ d'études à poursuivre.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

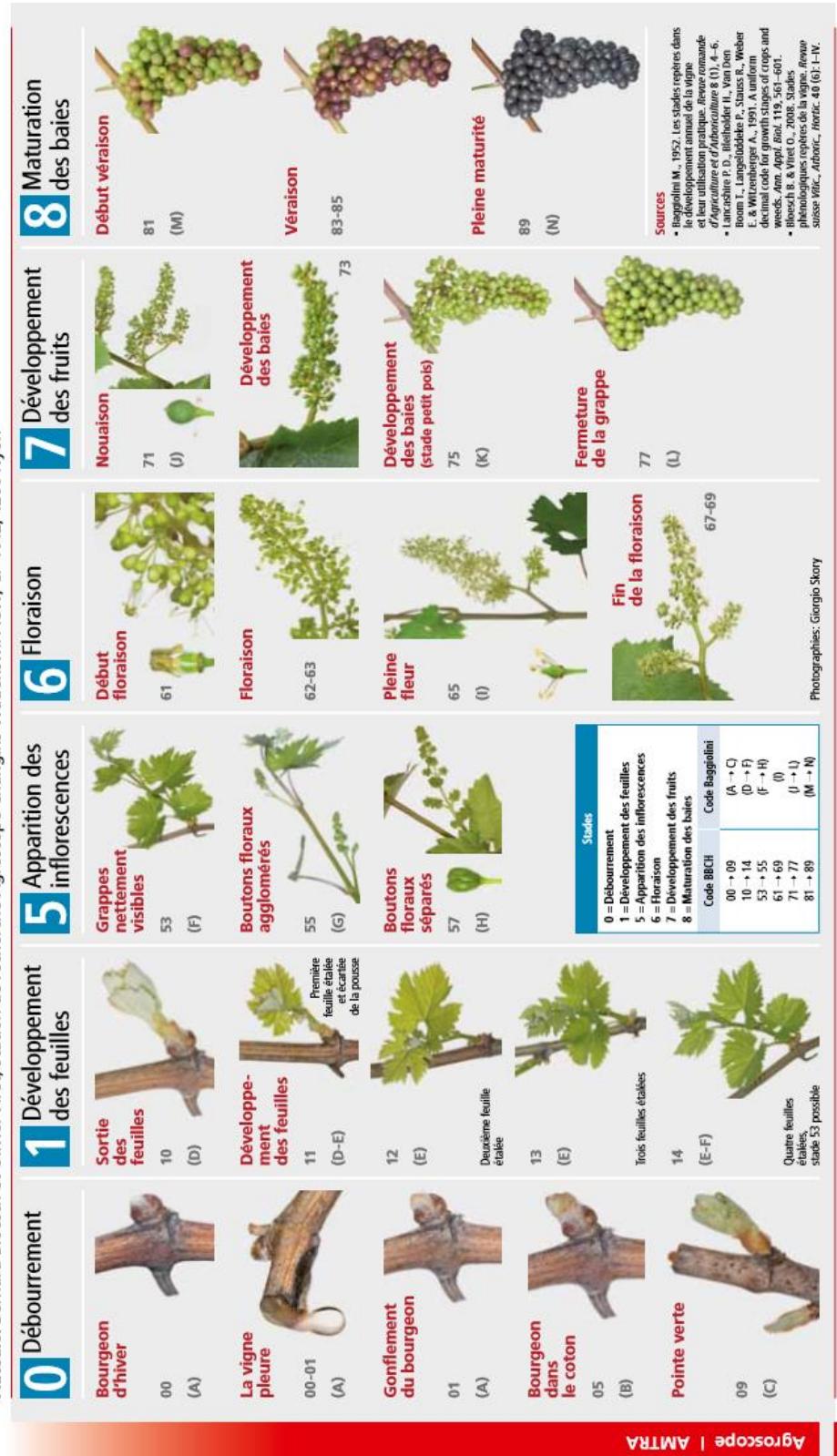
- Calderon A., Zapata J.M., Muniz R., Pedreno M.A. and Barcelo A.R., 1993. Resversatol production as a part of the hypersensitive like response of grapevine cells to elicitor from trichoderma viride. *New phytologist* **124**, 455-463
- Chiarappa L., 1959. Wood decay of the grapevine and its relationships with black measles disease, *Phytopathology* 49, pp. 510-519
- Cristinzio G. 1978. Gravi attacchi di Botryosphaeria obtusa su vite in provincia di Isernia. *Informatore Fitopatologico* **6**, 21-23
- Darrieutort G., Liminana J.M., Louvet C., Lecomte P., 2007. La relation entre l'Esca et le Black Dead Arm se précise. *Union Girondine*, Août 2007, p 41-45.
- Dubos B., 2002. Maladies cryptogamiques de la vigne, *Editions Féret*, Bordeaux
- Edwards J., Constable F., Wiechel T. et Salib S., 2007. Comparison of the molecular tests – single PCR, nested PCR and quantitative PCR (SYBR Green and TaqMan) – for detection of Phaeomoniella chlamydospora during grapevine nursery propagation. *Phytopathologia Mediterranea* **46**, 58–72
- Fussler L., Kobes N., Bertrand F., Maumy M., Grosman J. and Savary S., 2008. A characterization of grapevine trunk diseases in France from data generated by the National Grapevine Wood Diseases Survey. *Phytopathology*, **98**(5), p.571–579
- Goutouly J.P., 2010. Influence de la physiologie de la plante sur le développement de l'Esca. Compte-rendu de journée thématique « Les maladies du bois de la vigne », 16-17 novembre 2010, Villefranche/Saône, p. 20
- Graniti A., 1960. Il "mal dell'esca" della vite in Puglia. *Italia Agricola* **97**, 543-550.
- Grasso S., 1969. Il "mal dell'esca" della vite (Phellinus ignarius Patouillard) in Sicilia. *Tecnica Agricola*, **21**, 204-212
- Hong H., Pruden A., Reardon K.F., 2007. Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. *Journal of Microbiological Methods* **69**, pp 52-64
- Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J.N., Lee H. and Trevors J.T., 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 2004 **58**, pp169-188
- Larignon P. and B. Dubos, 1997. Fungi associated with esca disease in grapevine. European Journal of Plant Pathology 103, 147–157
- Larignon P., Fulchic R., Cere L., and Dubos B., 2001. Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathologia mediterraneae*. **40** : S336-S342.
- Larignon P. and Molot B., 2004. Les maladies du bois-Expérimentations en cours et premiers résultats. *Progrès Agricole et Viticole* **121**(21) : 459-463.
- Larignon P., Berud F., Viguier D., Dubos B. and Girardon K., 2004. Les maladies du bois en pépinière : importance de la propagation des champignons par le bois de greffage et efficacité du traitement à l'eau chaude à leur égard. *Le pépiniériste*, **156**, 10-13.
- Larignon P., 2005. Le point sur les maladies de dépérissement de la vigne. Journées techniques Fruits & Légumes et Viticulture Biologique, Beaune, Décembre 2005, p. 123-127.
- Larignon P., Muller M., Girardon K., Berud F., et Jacquet O, 2011. Maladies du bois en pépinières : identification des étapes clés.
- Lecomte P., M. Leyo, G. Louvet, M.F. Corio-Costet, J.P. Gaudillère and D. Blancard, 2005. Le Black dead arm, genèse des symptômes. *Phytoma* 587, 29–37
- Lecomte P., Darrieutort G., Liminana.M., Louvet G., Tandonnet J-P., Guerrin-Dubrana L., Goutouly J.P., Gaudillere J.P ET Blancard D., 2008 Esca de la vigne, vers une gestion raisonnée des maladies de dépérissement. *Phytoma* 2008 volume n° 616 P37-41.
- Lecomte P., 2009. UNION GIRONDINE des vins de Bordeaux - JUILLET 2009

- Lecomte P., Darrietort G., Laveau C., Blancard D., Louvet G., Goutouly J.-P., Rey P., Guérin- Dubrana L., 2011 - Impact of biotic and abiotic factors on the development of Esca decline disease.
- Lecomte P., Darrietort, Liminana J.M,G ,Comont, Muruamendaraz A.,Legorburu F-J, Choueiri E, Jreijiri F, El Amil R. and Fermaud M., 2012. New insights into Esca of grapevine: The development of foliar symptoms and their Association with xylem discoloration. *Plant Disease*/ vol.96 No 7.
- Lecomte, 2013. AVRIL 2013 - UNION GIRONDINE des vins de Bordeaux
- Lehoczky J., 1974. Black dead arm disease of grapevine caused by *Botryosphaeria stevensii* infection. *Acta Phytopathologica Academie Scientiarum Hungaricae* 9, 319–327
- Lee JP., Lee S.W., Kim C.S., Son J.H., Song J.H., Lee K.Y., 2006. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biol Control* **37**: 329-337
- Mugnai L., A. Graniti and G. Surico, 1999. Esca (black measles) and brown wood-streaking: Two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease* 83, 404–418
- Nocker A., Burr M., Camper A.K., 2007. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microbial Ecology* **54**, pp 276-289
- Prosser J.I., 2002. Molecular and functional diversity in soil microorganisms. *Plant and Soil* **244**, pp 9-17
- Rovesti L. and A. Montermini, 1987. Un deperimento della vite causato da *Sphaeropsis malorum* diffuso in provincia di Reggio Emilia. *Informatore Fitopatologico* **1**, 59–61
- Sparapano L., Bruno G., Graniti A., 2001. Three-year observation of grapevines cross-inoculated with escaassociated fungi. *Phytopathologia Mediterranea* **40**, Supplement, 376–386
- Surico G., Mugnai L. et Marchi G., 2006. Older and more recent observations on esca, a critical overview. *Phytopathologia Mediterranea*. **45**, S68–S86.
- Urbez-Torres J.R., 2011. The status of *Botryosphaeriaceae* species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* **50** (Supplement), S5–S45
- Zinger L., Gury J., Giraud F., Krivobok S., Gielly L., Taberlet P., and Geremia R.A., 2007. Improvements of polymerase chain reaction and capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism methods in microbial ecology: toward a high-throughput method for microbial diversity studies in soil. *Microbial Ecology* **54**, pp 203-216

ANNEXES

Stades phénologiques repères de la vigne

Auteurs: Bernard Bloesch et Olivier Viret, Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil ACW, CP 1012, 1260 Nyon



Agroscope | AMTRA

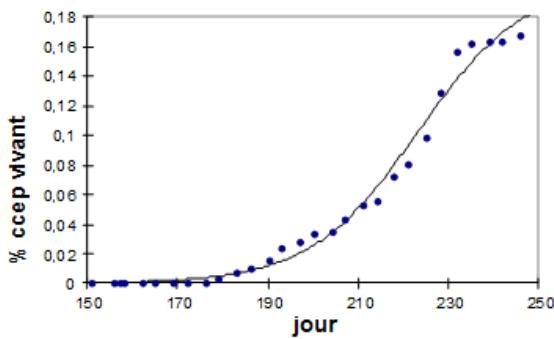
Annexe 1 : Représentation des stades phénologiques de la vigne selon le code Baggioini

Departement Federal de l'économie (DE) Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil ACW

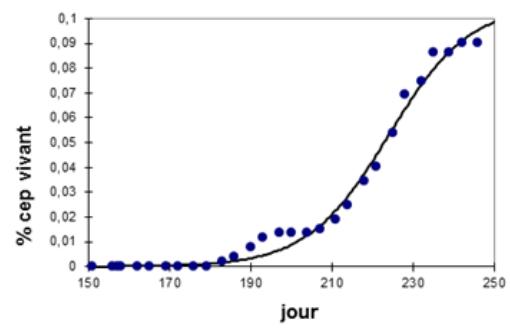
Schweizerische Eidgenossenschaft Confédération suisse Confederazione Svizzera Confederaziun svizra

Classification				
Regne	Phylum	Ordre	Famille	Genre
Fungi	Ascomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>
Fungi	Ascomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i>
Fungi	Ascomycetes	Dothideales	Dothioraceae	<i>Aureobasidium</i>
Fungi	Ascomycetes	Botryosphaeriales	Botryosphaeriaceae	<i>Botryosphaeria</i>
Fungi	Ascomycetes	Chaetothyriales	Chaetothyriaceae	<i>Chaetothyrium</i>
Fungi	Deuteromycetes	Capnodiales	Davidiellaceae	<i>Cladosporium</i>
Fungi	Ascomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Curvularia</i>
Fungi	Ascomycetes	Xylariales	Diatrypaceae	<i>Eutypa</i>
Fungi	Ascomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>
Fungi	Ascomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	<i>Gliocladium</i>
Fungi	Ascomycetes	Pleosporales	Lophiostomataceae	<i>Lophiostoma</i>
Fungi	Ascomycetes	Onygenales	Arthrodermataceae	<i>Microsporum</i>
Fungi	Ascomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>
Fungi	Ascomycetes	Xylariales	Amphisphariaceae	<i>Pestalotia</i>
Fungi	Ascomycetes	Diaporthales	Togniniaceae	<i>Phaeoacremonium</i>
Fungi	Ascomycetes	Incartae sedis	Incartae sedis	<i>Phaeomoniella</i>
Fungi	Ascomycetes	Diaporthales	Diaporthaceae	<i>Phomopsis</i>
Fungi	Ascomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae	<i>Saccharomyces</i>
Fungi	Ascomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	<i>Trichoderma</i>
Fungi	Ascomycetes	Hypocreales	Plectosphaerellaceae	<i>Verticillium</i>

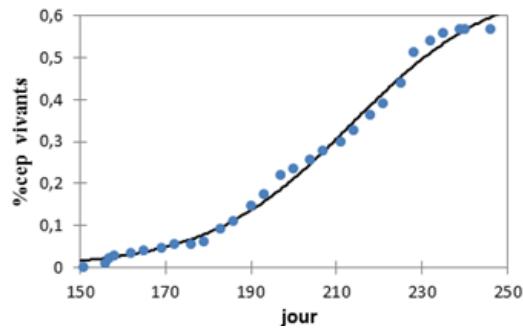
Annexe 2 : Principaux genres de champignons isolés à partir des tissus ligneux des plants de Cabernets francs et Sauvignon blanc



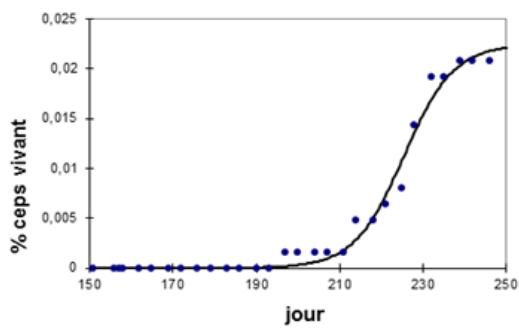
Cabernet franc – Cénac ($R^2= 0.987$)



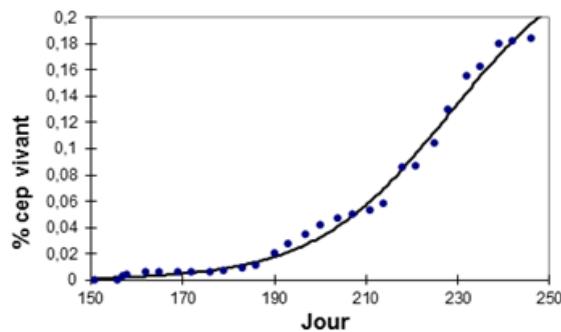
Malbec – Cénac ($R^2= 0.990$)



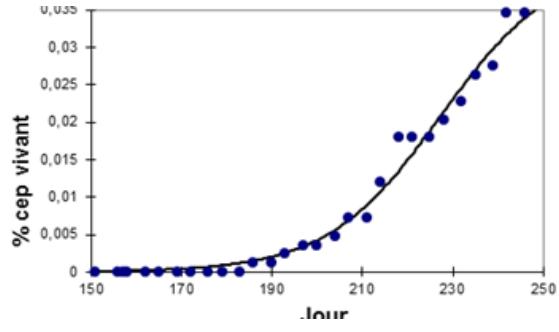
Sauvignon blanc – La Grande Ferrade ($R^2= 0.993$)



Merlot – La Grande Ferrade ($R^2= 0.985$)



Cabernet Sauvignon – Pessac ($R^2= 0.991$)



Merlot – Pessac ($R^2= 0.985$)

Annexe 3 : Courbes de régression obtenues en 2013

  	Diplôme / Mention : Master Spécialité : Production et Technologie du Végétal (ProTeV) Parcours : Productions Végétales Spécialisées Option : IA
Auteur(s) : Céline Bénétreau Date de naissance* : 13 / 02 / 90	Organisme d'accueil : INRA Bordeaux, UMR SAVE Adresse : 71 Rue Édouard Bourlaux 33140 Villenave-d'Ornon
Nb pages : 24 Annexe(s) : 3	Maître de stage : Pascal Lecomte
Année de soutenance : 2014	
Titre français : Etude des symptômes foliaires d'esca et caractérisation de la microflore des tissus ligneux	
Titre anglais : Study of esca-foliar symptoms and characterization of the microflora of woody tissues	
<p>Résumé : L'esca est une pathologie de dépérissement du bois de la vigne qui met en danger la pérennité des vignobles du monde entier. Les mécanismes d'induction d'expression des symptômes ainsi que le rôle des micro-organismes colonisant le bois de la vigne sont encore méconnus.</p> <p>Afin de mieux comprendre la cinétique d'évolution des symptômes, un suivi des symptômes au vignoble a été réalisé sur six parcelles présentant des sensibilités et des conditions pédologiques différentes. Le suivi de l'évolution des symptômes a permis de montré que l'esca et le BDA n'étaient en réalité qu'une seule et même maladie. Ce suivi a également permis la réalisation de courbes de régression modélisant la cinétique d'apparition des symptômes au cours du temps. Il s'avère que les données relevées au vignoble correspondent au modèle. Les variations de relevés de terrain au modèle peuvent se justifier par la sensibilité du cépage et les conditions environnementales. En effet, cette étude permet d'entrevoir une relation entre le type de sol, les variations de température et la réserve hydrique du cep. Ces facteurs impacteraient la cinétique d'expression des symptômes.</p> <p>La caractérisation de la microflore colonisant le bois sain et la bande brune des ceps a été réalisée via deux types d'approches : (i) une approche de microbiologie classique et (ii) une approche par empreinte moléculaire (SSCP). Pour les deux cépages étudiés, Cabernet franc et Sauvignon blanc, une microflore abondante et diversifiée, composée de nombreux champignons saprophytes et pathogènes, a été recensée à partir de 50 ceps. La comparaison de la microflore colonisant la bande brune, de sa formation jusqu'à six mois après l'expression des symptômes, permet de montrer qu'il existe une évolution de la microflore. Cela tend à confirmer que même si les <i>Botryosphaeria</i> spp. et les <i>Phomopsis</i> ne sont pas les champignons majoritairement présents lors de la formation de la bande brune, il n'est pas exclu qu'avec le temps ce type de lésion devienne un chancre à <i>Botryosphaeria</i> spp. ou chancre à <i>Phomopsis</i>. L'esca se présente donc comme une pathologie complexe, impactée par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques dont leur implication et leur rôle restent encore à démontrer.</p>	
<p>Abstract : Esca is a pathology of decline of the wood of the vine that threatens the sustainability of the worldwide spread vineyards. The induction mechanisms of symptoms expression and the role of microorganisms colonizing the wood of the vine are still unknown.</p> <p>To better understand the kinetic of evolution of symptoms, a monitoring of symptoms in the vineyard was performed on six plots with different sensitivities and different soil conditions. The monitoring of the evolution of symptoms has shown that Esca and BDA were actually one and the same disease. This monitoring was also allowed the realization of regression curves modeling the kinetics of appearance of symptoms over time. It turns out that the data collected in the vineyard matched the pattern. Deviations from the model can be justified by the sensitivity of the variety and environmental conditions. Indeed, this study provides a glimpse of relationship between soil type, temperature variations and water reserve of the vine. These factors would impact the expression kinetics of symptoms.</p> <p>Characterization of the microflore colonizing healthy wood and brown stripe of vines was conducted by using two approaches: (i) classical microbiology and (ii) molecular fingerprinting method : Single Strand Conformation Polymorphism (the SSCP). For both studied cultivars, Cabernet Franc and Sauvignon Blanc, abundant and diverse microflora, composed of many saprophytic and pathogenic fungi were identified from the 50 vines studied. The comparison of the microflore colonizing the brown stripe, to her formation up to six months after symptom expression, showed an evolution of the microflore. This tends to confirm that although <i>Botryosphaeria</i> spp. and <i>Phomopsis</i> are not fungi mainly present during the formation of the brown stripe, it is not excluded that in time this type of lesion becomes a Bot canker or <i>Phomopsis</i> canker. Esca is thus presented as a complex disease, caused by many biotic and abiotic factors with a confirmed involvement and role which still remain to be seen.</p>	
<p>Mots-clés : esca, BDA, expression des symptômes, bande brune, <i>Botryosphaeria</i>, microflore fongique, microbiologie, SSCP.</p> <p>Key Words: esca, BDA, symptom expression, brown stripe, <i>Botryosphaeria</i>, fungal microflora, microbiology, SSCP.</p>	

