



HAL
open science

Les maladies du bois de la vigne : recherches pour apporter des solutions de lutte aux Professionnels

P Larignon, P Bloy, J y Cahurel, C Cartier, M Claverie, M Coarer, M C Colosio, F Dias, A Douillet, N Jouandou, et al.

► To cite this version:

P Larignon, P Bloy, J y Cahurel, C Cartier, M Claverie, et al.. Les maladies du bois de la vigne : recherches pour apporter des solutions de lutte aux Professionnels. [Rapport de recherche] IFV. 2017. hal-03580499

HAL Id: hal-03580499

<https://hal.science/hal-03580499>

Submitted on 18 Feb 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Les maladies du bois de la vigne : mise en œuvre d'un programme de recherches pour apporter des solutions de lutte aux Professionnels

P. Larignon¹, P. Bloy², J.Y. Cahurel³, C. Cartier⁴, M. Claverie⁵, M. Coarer⁴, M.C. Colosio⁴, F. Dias⁶, A. Douillet¹, N. Jouandou⁵, S. Marchat¹, B. Mille⁶, M. Muller¹, J.N. Pascal³, A. Petit⁶, P. Saccharin⁶, G. Sentenac⁷, V. Viguès⁶, O. Yobregat⁶, B. Chatelet⁸, T. Decouchant⁸, F. Berud⁹, O. Jacquet⁹, V. Fabreguette¹⁰, D. Richy¹⁰, V. Aymé¹¹, F. Fontaine¹², V. Mondello¹², A. Spagnolo¹², L. Jacquens¹³, M. Adrian¹³ et S. Trouvelot¹³

¹Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV), Pôle Rhône-Méditerranée, 7 avenue Cazeaux, 30230 Rodilhan

²IFV, Pôle National Matériel Végétal, Domaine de l'Espiguette, 30230 Le Grau du Roi

³IFV, Pôle Bourgogne - Beaujolais - Jura – Savoie, 210 Boulevard Vermorel, BP 320, 69661 Villefranche/Saône Cedex

⁴IFV, Val de Loire Centre, Château de la Frémoire, 44120 Vertou

⁵IFV, Pôle Rhône-Méditerranée, Institut Rhodanien, 2260 Route du Grès, 84100 Orange

⁶IFV, Pôle Sud-Ouest, V'innopôle BP 22, 81310 Lisle-sur-Tarn

⁷IFV, Pôle Bourgogne – Beaujolais – Jura – Savoie, 6 rue du 16^{ème} Chasseurs, 21200 Beaune

⁸Sicarex Beaujolais, 210 Boulevard Vermorel, BP 320, 69661 Villefranche-sur-Saône Cedex

⁹Chambre d'agriculture du Vaucluse, Institut Rhodanien, 2260, Route du Grès, 84100, Orange

¹⁰Chambre d'agriculture des Bouches-du-Rhône, Maison des Agriculteurs, 22 Avenue Henri Pontier, 13626 Aix en Provence cedex 1

¹¹SPBPVV, 384, route de Caderousse, 84100 Orange

¹²URCA, Laboratoire Stress, Défenses et Reproduction des Plantes, Moulin de la Housse Bât. 18, BP 1039, 51 687 Reins cedex 2

¹³UMR 1347 Agroécologie, AgroSup/INRA/uB, Pôle Interactions Plantes-Microorganismes, ERL CNRS 6300, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon cedex

Correspondance : philippe.larignon@vignevin.com

2017

Résumé

Les travaux réalisés sur deux maladies du bois de la vigne (esca, BDA) ont montré leur effet sur la récolte et la croissance de la pousse printanière qui était annulé deux années après

l'apparition des symptômes. Ces maladies ont aussi conduit à des modifications des propriétés analytiques des moûts et des vins. Les vins issus de raisins collectés sur des ceps symptomatiques n'étaient pas toujours les plus dépréciés. Les études effectuées sur le cycle biologique ont permis de mettre au point des outils pour différencier les individus de deux espèces de *Botryosphaeriaceae* et des outils d'hybridation *in situ* qui permettront de les localiser précisément dans les tissus. Elles ont aussi identifié la période de sensibilité de la plante face à ces champignons et montré l'importance de deux facteurs (stade phénologique, charge) pour leur développement. Les organes porteurs de leurs sources d'inoculum ont été identifiés et une méthode a été mise au point pour les quantifier. Parmi les pratiques agronomiques testées (taille, densité, aménagement de coteaux), aucune n'influaient sur leur expression dans le vignoble, la situation semblait avoir plus d'importance que les pratiques testées. Enfin, la production de plants totalement exempts de champignons pathogènes ou moins porteurs n'a pas été efficace dans la lutte contre ces maladies.

Mots-clés : Black dead arm, esca, perte de récolte, vigueur, oenologie, *Botryosphaeriaceae*, cycle biologique, mode de conduite, lutte, matériel végétal, pépinières, *Vitis vinifera*

Abstract: Wood grapevine diseases: implementation of research programme to provide solutions to professionals

Studies on two grapevine wood diseases (esca, BDA) showed their effect on the yield and the spring shoot growth, which canceled two years after the onset of the symptoms. These diseases also led to changes in the analytical properties of musts and wines. Wines from grapes collected on symptomatic vines were not always the most depreciated. Life cycle studies have developed tools for population differentiation within two species of *Botryosphaeriaceae* and fluorescence *in situ* hybridization that will accurately localize them in tissues. They also identified the period of susceptibility of plants to these fungi and showed the importance of two factors (phenological stage, load) for their development. The organs carrying their inoculum sources have been identified and a method has been developed to quantify them. Among the agronomic practices tested (pruning systems, planting density, slope vineyard rearrangement), none influenced their expression in the vineyard, the situation seemed to be more important than the practices tested. Lastly, the production of plants totally free of pathogenic fungi or almost has been ineffective in the control of these diseases.

Keywords: *Botryosphaeria dieback*, esca, crop loss, vigour, oenology, *Botryosphaeriaceae*, life cycle, vine training system, control, plant material, nurseries, *Vitis vinifera*

Introduction

Les maladies du bois de la vigne d'origine cryptogamique (Black dead arm, Esca, Eutypiose) peuvent mettre en péril l'outil de production des viticulteurs et par conséquent la pérennité de leur exploitation. Ces maladies affaiblissent et/ou détruisent la charpente de la souche ce qui entraîne le plus souvent la mort du cep (Larignon, 2016). Selon l'enquête menée en France entre 2003 et 2008, la perte moyenne de surface productive varie de moins de 4 % à plus de 15 % selon les situations régionales et se situe autour de 11 % du vignoble français en 2008 (source DGAL). En 2015, elle a été estimée à 13 % (Rey *et al.* 2016). Des enquêtes ont été réalisées dans quelques régions françaises pour estimer les pertes économiques occasionnées par les maladies du bois. En Indre-et-Loire, elles entraînent chaque année des dégâts estimés entre 12 et 14 millions d'euros (source : les vignerons de la Touraine) ou encore dans le Gers à des pertes annuelles évaluées à 13 millions d'euros (source : Chambre d'agriculture du Gers). La charge financière que représente le remplacement des pieds morts est estimée au

minimum à 2 millions d'euros par an pour la filière bourguignonne, sans compter la perte de récolte (source Chambre d'agriculture de Bourgogne). Au niveau national selon Xavier de Volontat, président du comité recherche et développement de FranceAgrimer, les pertes se chiffrent actuellement de 3 à 5 millions d'hectolitres par an, quantités qui manquent pour asseoir le marché dans un contexte fortement concurrentiel, notamment à l'exportation (*in* Rapport de la commission sur les maladies de la vigne et du bois, juillet 2015, Assemblée Nationale). Outre les dégâts importants que provoquent les maladies du bois sur la pérennité du vignoble, elles conduisent également à des modifications de la qualité des vins. Des études ont montré que l'esca/BDA affecte la composition phénolique des grappes et décroît la qualité organoleptique des vins (Lorrain et al., 2012). La recrudescence de telles maladies dans le vignoble français est fortement liée à l'interdiction de l'arsénite de sodium en 2001, seule molécule efficace à l'égard de l'esca et du BDA (Larignon et al., 2008), du fait de sa toxicité (Spinosi et Févotte, 2008). Sa suppression inquiète d'autant plus les viticulteurs qu'aucune méthode de lutte de remplacement ne leur a été proposée.

La difficulté de ne pas avoir trouvé de solutions depuis l'interdiction de l'arsénite de sodium est liée à plusieurs facteurs : i) la complexité de ces maladies se manifestant sous diverses formes dans le vignoble et impliquant plusieurs agents pathogènes, et dépendant d'autres facteurs extérieurs d'origine biotique ou abiotique, ii) la durée très longue des expérimentations pour mettre en évidence une éventuelle efficacité d'un produit ou d'un itinéraire technique, puisque les symptômes ne s'expriment le plus souvent qu'à partir de 7 ou 8 ans après la plantation et iii) le développement des agents pathogènes dans les tissus ligneux qui sont donc difficiles à atteindre contrairement aux agents pathogènes qui touchent les organes herbacés comme les agents de l'oïdium ou du mildiou. En dépit de ces difficultés et dans l'objectif d'aider la viticulture à sortir de cette impasse technique, il est important de proposer *in fine* des moyens de lutte pour contrôler ces maladies, qui doivent être efficaces, respectueuses de l'environnement et économiquement acceptables pour les exploitations.

Pour atteindre ces objectifs, notre programme s'est intéressé à apporter d'une part de nouvelles connaissances sur ces maladies et d'autre part à dégager des pistes utiles pour l'ensemble de la filière. Ce projet s'est reposé sur un partenariat entre l'Institut Français de la Vigne et du Vin, l'UMR Agroécologie de Dijon, l'URCA, la Sicarex, les Chambres d'agriculture et les pépiniéristes. Le programme s'est articulé autour de cinq axes :

- i) mesurer l'impact des maladies du bois sur la vigueur et la production des ceps ;
- ii) évaluer aussi leur impact sur les propriétés analytiques des moûts et des vins ainsi que leur effet sur la fermentation
- iii) apporter de nouvelles informations sur le cycle biologique des *Botryosphaeriaceae*, associés au Black dead arm, impératif à connaître pour identifier les périodes d'intervention pour la lutte dans le vignoble,
- iv) connaître l'influence de certains facteurs environnementaux (mode de conduite) à leur égard,
- v) évaluer des stratégies pour limiter la présence des champignons associés aux maladies du bois dans les plants en sortie de pépinières.

1. Incidence des maladies du bois sur la vigueur et la production des ceps

La dégradation du feuillage, la mortalité liée à l'apoplexie, l'altération qualitative des raisins ainsi que les pertes de rendement sont les inconvénients les plus souvent décrits chez les vignes affectées par les maladies du bois de la vigne (esca, BDA). Peu d'informations sont cependant données sur l'impact des symptômes se manifestant sur la partie herbacée sur la vigueur et la production du cep. Notre étude s'est ainsi intéressée à suivre le devenir de ceps

malades tout au long des saisons végétatives suivantes en caractérisant la mortalité hivernale, le retard de la croissance de la pousse printanière, la vigueur mesurée par le poids de taille et le rendement par le poids de récolte. Initiée en 2014, cette étude a été menée sur deux parcelles situées dans la région PACA, conduites en cordon bilatéral, et plantées en 1984 (Cabernet-Sauvignon/SO4) et en 1997 (Grenache noir/110R). Le devenir des coursons notés asymptomatiques et symptomatiques en 2014 a été suivi pendant une année pour la parcelle de Cabernet-Sauvignon et deux années consécutives pour la parcelle de Grenache. Ces observations ont montré un impact marqué du symptôme de l'année en cours sur la mortalité des coursons concernés, avec des incidences variant entre les années, les parcelles et surtout le type de symptôme foliaire (Tableau 1). Les formes sévères caractérisées par une défoliation des rameaux induisaient plus de mortalité des coursons que les symptômes plus légers.

Tableau 1 : Taux de mortalité (%) observé suite à la taille des coursons exprimant différents degrés d'expression

Parcelles	Grenache			Cabernet-Sauvignon		
	2014	2015	2016	2014	2015	2016*
Forme sévère	96	89	69	65	24	60
Forme mixte (sévere + lente)	-	75	70	-	-	-
Forme lente	57	46	29	17	10	0
Sans symptômes mais sur ceps ayant auparavant exprimé des symptômes	6	38	26	3	6	1
Sans symptômes (cep asymptomatique)	3	13	6	0	0	0

*faible effectif (cinq coursons)

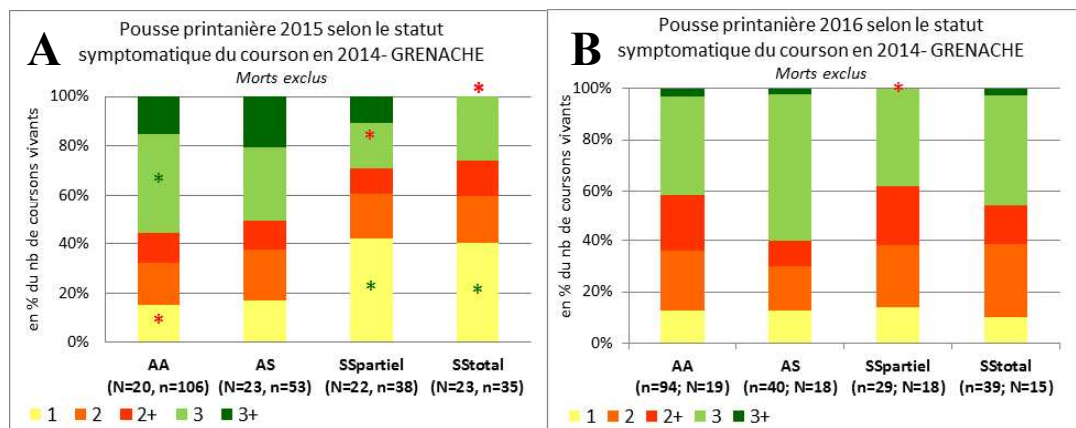


Figure 1 : Croissance de la pousse printanière en 2015 (A) et 2016 (B) selon la classe de symptômes en 2014.

AA : coursons (Asymptomatiques) issus de ceps Asymptomatiques en 2014 (=témoin) ; AS : coursons Asymptomatiques issus de ceps Symptomatiques en 2014 (ceps partiellement symptomatiques) ; SSpartiel : coursons Symptomatiques issus de ceps partiellement Symptomatiques en 2014 ; SStotal : coursons Symptomatiques issus de ceps Symptomatiques en totalité en 2014. Les notes 1 à 3+ correspondent à des classes d'estimation visuelle de la pousse printanière. 1 étant une pousse chétive et 3+ une pousse vigoureuse, supérieure à une pousse normale de la parcelle (note 3). Le n correspond au nombre coursons et N au nombre de ceps d'où sont issus ces coursons.

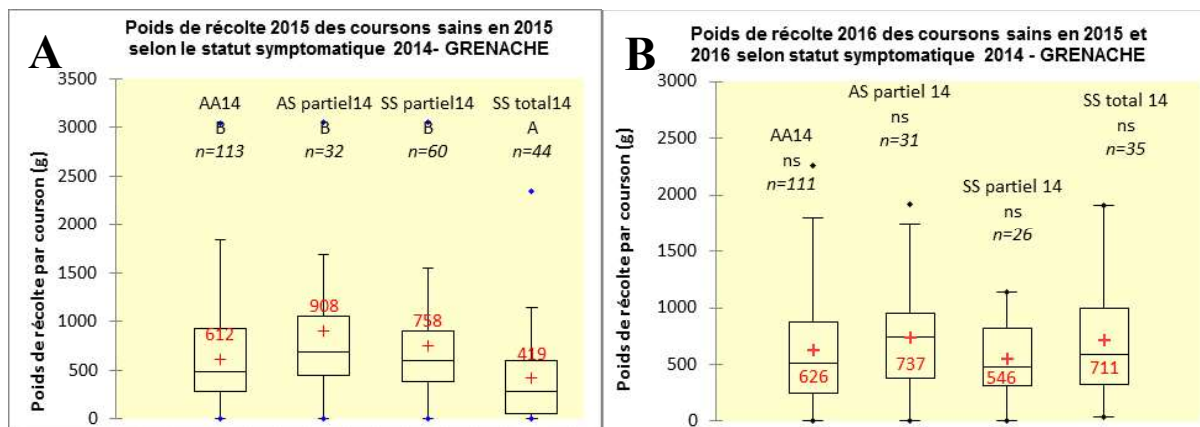


Figure 2 : Poids de récolte par courson en 2015 (A) et 2016 (B) selon la classe de symptômes en 2014 (n : nombre de coursons). Test non paramétrique de Dunn à p=0,05. Voir la légende de la figure 8 pour la signification des lettres AA, AS, SSpartiel et SStotal.

Sur la base des observations réalisées en 2014, 2015 et 2016, il est ressorti que les symptômes foliaires s'exprimant l'année n conduisaient à un retard de la croissance de la pousse printanière l'année n+ 1 (Figure 1A) et une diminution du poids de récolte chez les ceps qui étaient totalement symptomatiques (Figure 2A). Ils n'engendraient cependant pas de perte de bois de taille par courson. Enfin, les dégâts observés chez les ceps exprimant des symptômes sur la partie herbacée l'année n s'estompaient en année n+2 (rétablissement de la production, plus aucun effet sur la croissance de la pousse printanière), l'année 2015 sans expression de symptômes semblait avoir restauré l'état du cep (Figures 1B et 2B).

Concernant la nuisibilité sur les trois années de suivi, elle était surtout liée au taux de ceps manquants qui constituait l'essentiel de la perte quantitative de la récolte. La perte de rendement enregistrée au cours du suivi variait entre 15 % et 25 %.

Ce travail a permis aussi d'apporter des précisions sur la description des symptômes chez des vignes taillées en cordon (taille courte) : i) la plus petite unité d'expression des symptômes est le courson, ii) les deux formes d'expression (forme lente et sévère) peuvent être trouvées sur la même plante, iii) les symptômes surviennent par épisodes, c'est-à-dire le cep peut être atteint en plusieurs fois (courson après courson).

2. Impact des maladies du bois sur la qualité des moûts et des vins

Peu de travaux ont été réalisés sur l'impact des maladies du bois sur les caractéristiques et la qualité organoleptique des vins (Calzarano et al., 2001, 2004, Lorrain et al., 2012). Ainsi, notre travail a apporté des informations sur ces points, notamment sur les vins blancs.

Initiée en 2014 et poursuivie en 2015 et 2016 dans le Val de Loire sur deux parcelles de cépages différents (Melon de Bourgogne et Sauvignon blanc) caractérisées par une forte présence de symptômes de l'esca/BDA comprise entre 5 et 10 % d'expression, cette étude a permis de montrer par comparaison de ceps symptomatiques à des ceps asymptomatiques i) une perte du nombre de grappes par cep (de - 13 % à - 48 %), de récolte estimée par le poids des grappes (de - 17 % à - 45 %) et de jus au pressurage (de - 3 % à - 14 %), ii) et un retard de la maturation, au niveau des moûts après débouillage, caractérisé par une baisse de la teneur en sucres, une augmentation de l'acidité totale, de l'acide malique et de l'azote assimilable et une fermentescibilité accrue (Tableau 2).

Tableau 2 : Quelques caractéristiques de moûts après débouillage issus de récoltes prélevées sur des ceps sains ou malades (mal.). Les valeurs en gras correspondent aux valeurs étant distinctes entre les deux modalités.

Cépages	Melon de Bourgogne						Sauvignon	
Années	2014		2015		2016		2016	
Etat	sain	mal.	sain	mal.	Sain	mal.	Sain	mal.
<i>Dates d'analyse</i>	20/09	20/09	21/09	21/09	28/09	28/09	03/10	03/10
Sucres g/L	184,2	172,7	170	156	172,2	169	186	163
Acidité totale g H₂SO₄/L	5,83	6,69	4,4	5,1	4,41	4,72	5,99	7,25
pH	3,09	3,12	3,15	3,15	3,21	3,21	3,03	2,94
Azote assimilable mg/L	148	161	53	97	98	112	81	116
Acide malique g/L	4,8	5,7	4,2	5,3	3,78	3,84	4,13	5,44
Acide tartrique g/L	5	5,7	3,8	3,3	4,8	5,0	6,1	6,6

Des différences ont été presque toujours observées lors des fermentations alcooliques au niveau de leur durée pour les moûts issus des parcelles de Sauvignon (en 2016) et de Melon de Bourgogne (en 2014 et 2015). Les moûts issus de raisins prélevés sur des ceps malades avaient leur durée de fermentation plus rapide que ceux venant de fruits collectés sur des plantes asymptomatiques. En 2016, les cinétiques étaient similaires pour la parcelle de Melon.

Enfin, concernant les caractéristiques et la qualité des vins obtenus (Tableau 3), il a été montré une différence significative entre les deux types de vins au niveau de l'acidité totale, la teneur en acide malique et celle en certains composés aromatiques. Les vins issus de grappes malades présentaient toujours une acidité totale plus élevée, des teneurs en 2-phényléthanol plus faibles (de -17 % à -53 % selon les années et la parcelle) et des teneurs en acétates soit plus élevées (de +70 % en 2014 et +10 % en 2015), soit plus faibles (de -13 % à -17 % en 2016). Les vins issus de grappes malades montraient des teneurs en acétate d'isoamyle plus importantes (de 16 à 20 %). Aucune différence n'était observée entre les deux catégories de vins pour les esters dans son ensemble. La dégustation de tels vins a montré que celui réalisé à partir de grappes prélevées sur des ceps malades n'était jamais le moins apprécié et était au contraire souvent l'un des préférés.

Tableau 3 : Quelques caractéristiques de vins issus de récoltes prélevées sur des ceps sains ou malades (mal.). Les valeurs en gras correspondent aux valeurs étant distinctes entre les deux modalités.

Cépages	Melon de Bourgogne						Sauvignon	
Années	2014		2015		2016		2016	
Etat	sain	mal.	sain	mal.	Sain	mal.	Sain	mal.
TAV % vol	12,49	12,25	12,07	11,76	11,83	11,86	13,43	13,13
Sucres g/L	1	0,9	1,4	2,3	1,3	1,3	1	1,1
Acidité totale g H₂SO₄/L	5	5,27	4,39	4,66	4,09	4,22	5,64	6,45
Acidité volatile g H₂SO₄/L	0,24	0,29	0,2	0,11	0,20	0,18	0,28	0,28
pH	3,02	3,05	3,25	3,29	3,28	3,28	3,04	2,98
Acide malique g/L	3,3	4,2	3,5	4,1	2,9	3	3,6	4,1
Acide tartrique g/L	3,2	2,6	1,7	1,5	2,1	2,2	3,5	3,8

3. Identification du cycle biologique des champignons associés aux maladies du bois

La lutte contre les maladies du bois de la vigne telles l'esca ou le Black Dead Arm nécessite une bonne connaissance du cycle biologique des champignons qui y sont associés. Les études menées visant à le déterminer permettront *in fine* de connaître les cibles à protéger, la période d'intervention et les sources d'inoculum à éradiquer. Les travaux ont porté surtout sur celui

des *Botryosphaeriaceae*. Les études effectuées ont consisté à mettre au point des outils qui permettront de différencier les populations de *Botryosphaeriaceae* et des outils d'hybridation *in situ* qui permettront de les localiser de façon précise dans les tissus ligneux. Elles ont aussi concerné la détermination des périodes de sensibilité de la plante face à ces champignons et l'identification de l'époque à laquelle ils se développent dans les rameaux. Enfin, elles ont porté sur l'identification des organes porteurs des sources d'inoculum. Une méthode a été mise au point pour les quantifier dans l'objectif de définir par la suite leur seuil de nuisibilité.

3.1. Mise au point des outils permettant de distinguer les populations différentes entre elles (RAPD)

La création d'outils infraspécifiques a permis d'apporter des informations sur la biodiversité des *Botryosphaeriaceae* dans le vignoble. La mise au point de tels outils a été basée sur les travaux de Lubeck et al. (1998) et de Billones-Baajens (2011) portant sur une technique de caractérisation infra-spécifique d'UP-PCR sur l'espèce *Neofusicoccum luteum*, sur les techniques de RAPD utilisées sur l'espèce *Botrytis cinerea* (Coarer et al., 1999) et sur les études effectuées par Qiu et al. (2015) sur les *Botryosphaeriaceae* australiennes. Au total, sept amorces ont été testées sur dix souches de *Botryosphaeriaceae* isolées dans le vignoble du Val de Loire. Deux amorces ont été ainsi retenues (L15 et B15). Une fois que les conditions optimales de leur amplification ont été obtenues, une étape de validation a été effectuée sur 37 souches de *Diplodia seriata* et 27 souches de *Neofusicoccum parvum* isolées de ceps asymptotiques ou malades, provenant de différentes parcelles du Val de Loire et conservées dans le CRB « Micro-organismes Vigne et Vin ». Pour *D. seriata*, l'amorce L15 a livré trente profils différents contre vingt-six pour l'amorce B15, correspondant à des diversités respectives de 81 et 70 % donnant une diversité globale de 86,5 % et une diversité moyenne de 82,6 %. Quant à *N. parvum*, l'amorce L15 n'a livré que douze profils et l'amorce B15 seulement deux, conduisant à une diversité globale de 51,8 %.

Pour pallier ce manque de révélation de polymorphisme chez *N. parvum* et avoir testé deux autres amorces F16 et AA2M2 des sept amorces retenues initialement et ne donnant pas également de satisfaction, le travail s'était porté sur vingt amorces RAPD de la série OPERON A1 à A20. Parmi ce panel, l'amorce OPERON A2 s'était révélée suffisamment polymorphe pour distinguer les différentes souches de *N. parvum* (Figure 3). Après son optimisation, elle a été appliquée sur 19 souches de la même espèce isolée de ceps malades et sains provenant de différentes parcelles du Val de Loire. Ce travail a permis ainsi de mettre en évidence 90 % de polymorphisme.

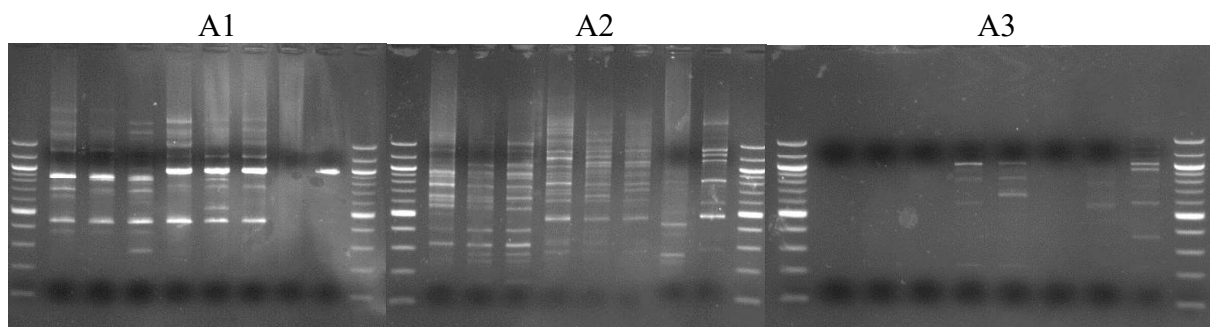


Figure 3 : Essai de différentes amorces sur un panel choisi d'isolats de *N. parvum*

3.2. Mise au point d'une méthode d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) des *Botryosphaeriaceae*

La mise au point d'outils moléculaires d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) a pour objectif de localiser précisément *in planta* les deux espèces de *Botryosphaeriaceae* les plus représentées en France (*N. parvum* et *D. seriata*) et de décrire leur répartition tissulaire (niche

écologique, cohabitation dans certaines zones tissulaires). Initié en 2015, ce travail a tout d'abord consisté, par l'alignement de séquences réalisés au niveau de la séquence 28S de la grande sous-unité ribosomale 60S, à identifier deux zones d'intérêt permettant de différencier les deux espèces fongiques cibles vis-à-vis des autres *Botryosphaeriaceae*, de champignons saprophytes ou pathogènes ainsi que de bactéries pouvant être présents chez la vigne. Ces séquences ne montraient pas d'homologie pour les séquences végétales (vigne), ni pour des mini-ARN référencés. Lors du design et de la réalisation des sondes, des acides nucléiques modifiés (LNA) ont été positionnés pour améliorer leur spécificité au cours des phases d'hybridation. Le choix de la méthode de révélation du signal s'était porté vers un marquage indirect des sondes par l'intermédiaire d'anticorps (primaires et secondaires) permettant une amplification du signal. La sonde Np a été évaluée sur des coupes de mycéliums isolés, provenant de cultures de *N. parvum* (témoin positif) et de *D. seriata* (témoin négatif). Après sa mise au point pour obtenir un signal spécifique et de bonne qualité (paramètres d'immuno-détection, paramètres de blocage et rinçage post-hybridation), elle a été testée sur d'autres espèces fongiques appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae*, mais aussi aux espèces saprophytes et pathogènes couramment rencontrées dans le vignoble. Dans les conditions d'utilisation, elle apparaît performante pour discriminer *in vivo* cette espèce fongique d'autres *Botryosphaeriaceae* ainsi que des champignons saprophytes et pathogènes. Un travail équivalent à celui réalisé pour la mise au point de la sonde Np a été entrepris pour la mise au point de la sonde Ds. Ces sondes seront testées dans de futures recherches sur des boutures inoculées par chacun des agents pathogènes et sur des plantes infectées naturellement.

3.3. Identification de la période de sensibilité de la plante face aux *Botryosphaeriaceae*

Initiée en 2012, cette étude réalisée sur une parcelle de mourvèdre située dans les Costières de Nîmes, conduite en cordon et plantée en 1997, a permis de définir la période de sensibilité de la plante face à ces champignons. Elle a porté sur deux périodes distinctes : la période végétative et la période de repos.

Pour la période végétative, l'inoculation de *D. seriata* et de *N. parvum* dans des rameaux herbacés blessés superficiellement au niveau du troisième entre-nœud à différents stades phénologiques (stade G, floraison, véraison) a permis de reproduire les nécroses dans le bois, lorsque les inoculations ont été effectuées à partir de la floraison jusqu'à la véraison. Au stade phénologique « inflorescence visible », les nécroses étaient similaires à celles observées chez le témoin (blessé non inoculé), montrant qu'à ce stade la plante n'était pas sensible. Le non développement des champignons après ce stade alors qu'ils étaient présents, suggère que la plante les a compartimentés. En 2012 et 2013, sur la même expérimentation, des rameaux inoculés ou non ont aussi été prélevés pour être caractérisés au niveau protéomique selon la méthode de Spagnolo et al. (2012). Par cette approche il a été montré qu'au stade non sensible (inflorescence visible), la plante produisait plus de protéines impliquées dans le métabolisme primaire, les réponses de défense et le stress oxydatif (réaction d'oxydo-réduction), contrairement au stade plus sensible (la floraison) (Spagnolo et al., 2014). Afin de montrer la moindre contribution des systèmes de défense à ce stade sensible via le détournement du métabolisme de la plante au profit de la floraison, une étude a porté sur la comparaison du comportement de plantes avec des inflorescences à celles sans inflorescences face à *D. seriata* et *N. parvum*. Ce travail, effectué pendant deux années consécutives (2014-2015) selon le même protocole que précédemment, a permis non seulement de confirmer les résultats obtenus en 2013, mais aussi de montrer qu'à la floraison, la plante était plus sensible à cette agression en présence des inflorescences (Spagnolo et al., 2017). En effet, les nécroses développées dans les tissus ligneux étaient plus importantes. Les gènes étudiés en lien avec les réponses de défense de la plante (voies des phénylpropanoïdes, stilbène synthase, chalcone

isomérase, protéines PR, glucanases, protéine semblable à la thaumatine, chitinase) avaient une expression plus induite en absence des inflorescences en 2014 ce qui pourrait expliquer des nécroses de plus petite taille. En 2015, cette tendance a été de nouveau observée mais toutefois moins marquée (Spagnolo et al., 2017). Ainsi, la charge et le stade phénologique sont deux facteurs favorisant la progression des *Botryosphaeriaceae* dans la plante.

Lors de la période de repos de la vigne (2014-2017), les contaminations réalisées à trois périodes (décembre, janvier, mars) au niveau du troisième entre-nœud du sarment ont indiqué la non sensibilité de la plante face à ces champignons. Les nécroses de taille similaire à celle observée chez les témoins (blessés et non inoculés), se traduisant par des lignes noires en coupes longitudinales, étaient de petites tailles et superficielles. Onze mois après la première observation, elles n'avaient pas évolués.

3.4. Identification de la période de colonisation des rameaux par les *Botryosphaeriaceae*

Les champignons de la famille des *Botryosphaeriaceae* peuvent être présents sur les écorces et dans les tissus ligneux des sarments comme le montrent de précédentes études (Epstein et al., 2008). La période de la colonisation des sarments par ces champignons n'est pas connue et a fait ainsi l'objet de cette étude menée pendant quatre années consécutives (2012 à 2015). Ce travail a été réalisé sur une parcelle de mourvèdre fortement affecté par le BDA située dans les Costières de Nîmes. Ayant été effectuées selon la méthode d'isolement de Larignon et Dubos (1997) au niveau des écorces et des tissus ligneux de coursons et des trois ou quatre premiers entre-nœuds prélevés à différents stades phénologiques (inflorescences clairement visibles, floraison, fermeture de la grappe, véraison, après vendange, chute des feuilles) sur des ceps n'exprimant apparemment pas de symptômes, les analyses microbiologiques ont permis de montrer la présence de *D. seriata* surtout sur les écorces des deux premiers entre-nœuds ainsi que dans les tissus ligneux dès la première collecte (Figure 4A). Sa présence était devenue de plus en plus importante ou non au fur et à mesure que le cycle végétatif était avancé, notamment à partir de la véraison ou de la chute des feuilles (Figure 4B). Ainsi, pour connaître à quelle époque les rameaux sont déjà contaminés, de nouveaux travaux devront être réalisés entre la période du débourrement et le stade inflorescences visibles.

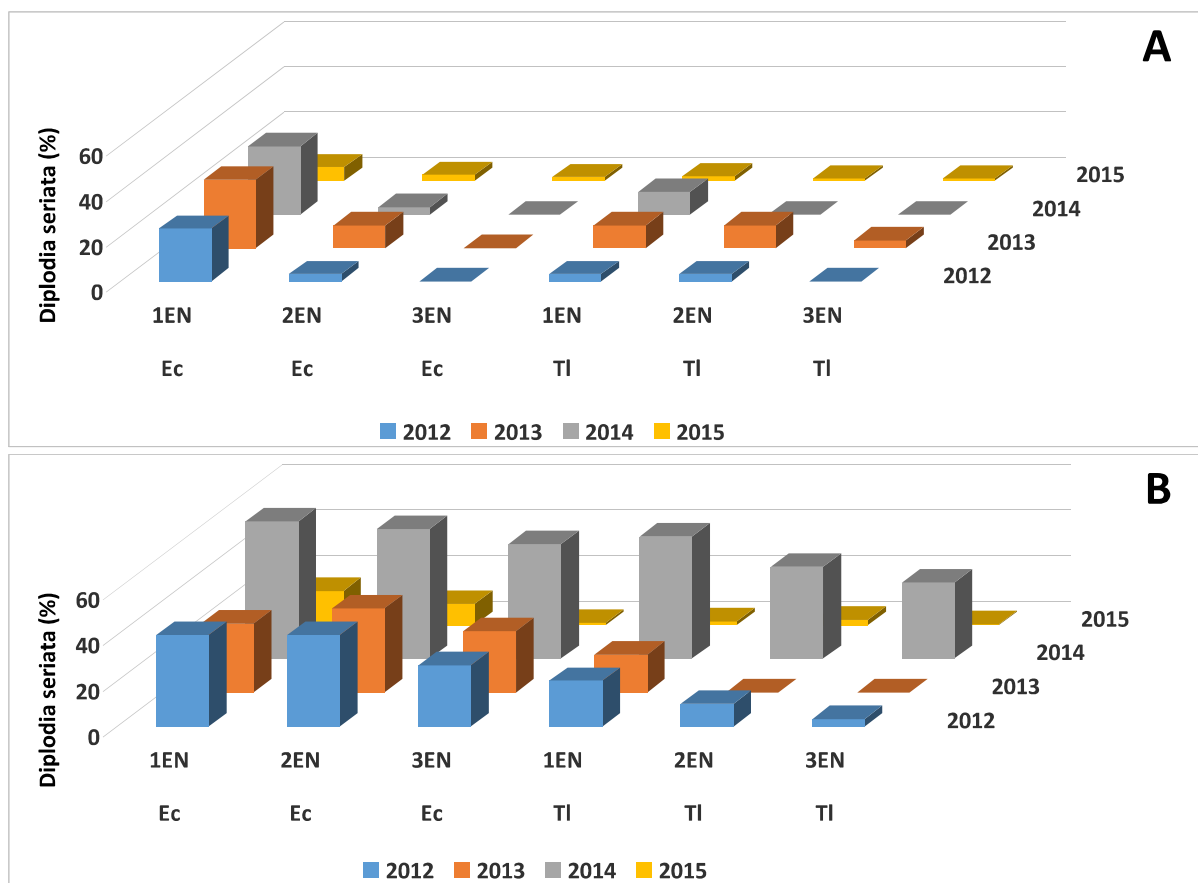


Figure 4 : Localisation de *D. seriata* dans les rameaux prélevés au stade inflorescences clairement visibles (A) et au stade chute des feuilles (B) en fonction des années. Ec : écorces, TI : tissu ligneux ; 1EN, 2EN, 3EN correspondent respectivement aux premiers, deuxièmes et troisièmes entre-nœuds.

En 2016, l'étude a porté sur la comparaison de rameaux malades et de rameaux apparemment sains à deux stades phénologiques (fermeture de la grappe et véraison). *Diplodia seriata* a été plus souvent trouvé sur les écorces et dans les tissus ligneux des coursons et des différents entre-nœuds de ceps malades (Figure 5). La localisation des *Botryosphaeria* au sein des rameaux pose des questions sur leur origine. Leur présence provient-elle de contaminations à partir de la surface via des microfissures ou d'ouvertures naturelles ou de leur colonisation via le courson ? La mise au point des outils présentés dans les paragraphes 3.1. et 3.2. permettra d'apporter une réponse à cette interrogation lors de futures recherches.

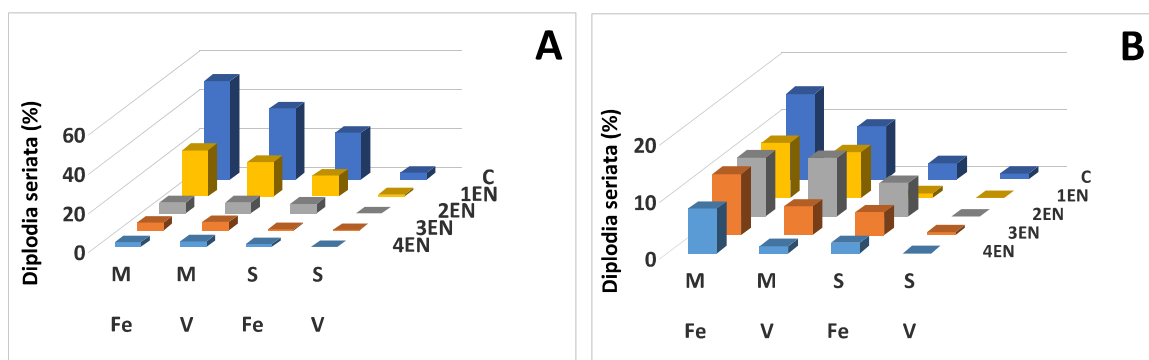


Figure 5 : Localisation de *D. seriata* sur les écorces (A) et au sein des tissus ligneux (B) chez des rameaux sains (S) et malades (M) prélevés lors de la fermeture de la grappe (Fe) et la véraison (V). C, 1EN, 2EN, 3EN, 4EN.

1EN, 2EN, 3EN correspondent respectivement aux coursons, premiers, deuxièmes et troisièmes entre-nœuds.

3.5. Identification des sources d'inoculum des *Botryosphaeriaceae* et leur quantification dans le vignoble

Les sources d'inoculum des *Botryosphaeriaceae* ont été rapportées dans différentes études (Larignon et Dubos, 2001). Elles ont été observées à la surface d'anciennes plaies de taille, de chancres ou encore trouvés sur les sarments laissés au sol, mais elles n'ont pas été quantifiées. Cette quantification a fait l'objet de cette étude pendant trois années consécutives (2014 à 2016) sur une parcelle de mourvèdre fortement atteinte située dans les Costières de Nîmes. La méthodologie utilisée n'a pas été basée sur l'observation des pycnides au vignoble (car impossible à réaliser), mais sur une méthode indirecte qui consistait à découper les organes prélevés en un nombre de fragments qui ont été déposés ensuite sur un milieu de culture. Le dénombrement des pièces sur lesquelles se développaient *D. seriata* a permis d'avoir un ordre de grandeur de sa présence dans le vignoble. La collecte des organes a été faite au hasard chaque saison et a concerné les anciennes plaies de taille, les sarments laissés sur le sol, les coursons, les vrilles et les rafles. Ce travail a ainsi permis de montrer après analyse de 2000 fragments par date de collecte et organe que l'inoculum était surtout présent sur les anciennes plaies de taille, les écorces de coursons et les sarments laissés au niveau du sol. Cet inoculum est resté, d'une manière globale, aussi important tout le long de l'année et variait peu ou prou entre les dates de collecte (Figure 6). Il a été cependant moins trouvé sur les rafles (entre 4,15 et 12,2 %) et les vrilles (entre 0,2 % et 2,8 % selon la date de collecte), à l'exception de 2014 (année à forte expression de symptômes dans le sud-est de la France).

Cette méthode de quantification pourra ainsi être utilisée pour réaliser une enquête sur un plus grand nombre de parcelles ayant des niveaux d'expression de maladies différents dans l'objectif de définir le seuil de nuisibilité.

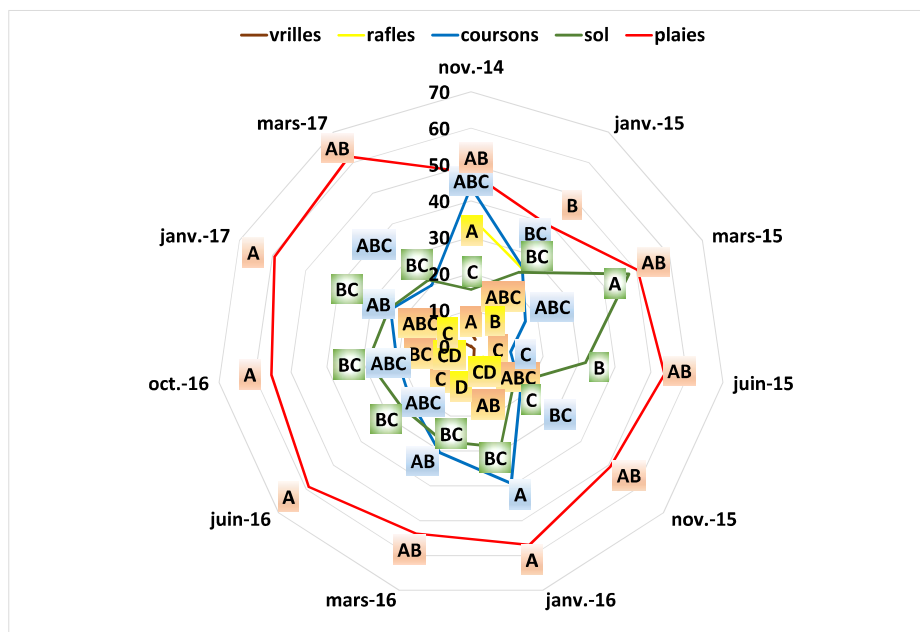


Figure 6 : Localisation et quantification de l'inoculum de *D. seriata* entre novembre 2014 et mars 2017. Les lettres de la même couleur correspondent aux groupes classés par le test de Tukey (HSD) pour un organe donné.

4. Influence des facteurs environnementaux

Les connaissances sur les facteurs agronomiques pouvant influencer sur le développement des maladies du bois, sont très incomplètes du fait de l'interaction de ces différents facteurs entre eux et des conditions climatiques. La mise en place depuis plusieurs années d'un programme d'expérimentation concernant la modification des modes de conduite en Beaujolais, a pris en compte, outre les autres contrôles classiques, la sensibilité à ces maladies (eutypiose, esca/BDA). Ce travail a pour objectif de mettre en évidence l'influence de quelques pratiques culturales sur leur extériorisation.

Les pratiques sur lesquelles ont porté ces études sont les systèmes de taille, la densité de plantation et l'aménagement de coteaux. L'effet de la première pratique a été évalué sur deux parcelles de cépage Gamay. Sur la première parcelle, plantée en 1985, les systèmes de taille testés étaient : le guyot avec deux modalités de charge – 6 yeux et 3 yeux, le cordon simple, le cordon double et la taille gobelet monté. Sur la seconde parcelle, plantée en 1986 ont été évalués le gobelet classique palissé sur échelas, l'éventail, le gobelet monté, le cordon simple, et le cordon double. Quant à l'effet de la densité sur l'extériorisation des symptômes des maladies du bois, il a été mesuré sur deux parcelles de Gamay, plantées en 1995 et 1997, conduites en cordon sur lesquelles les densités de plantation à comparer étaient : 1,35 x 0,9 m avec une hauteur de tronc de 40 cm, 1,80 x 1 m avec une hauteur de tronc de 60 cm et 3 x 1 m avec une hauteur de tronc de 60 cm. Enfin, l'aménagement de coteaux a été réalisé sur trois parcelles de même cépage plantées en 1978, 1990 et 1993, sur lesquelles ont été testées les modalités : témoin en gobelet à densité élevée (10000 ceps/ha), arrachage de 1 rang sur 3 et transformation du gobelet en cordon, arrachage de 1 rang sur 2 et transformation du gobelet en cordon.

Le suivi de l'évolution des symptômes, effectué pour le plus ancien essai en 1995 et poursuivi depuis 2014 dans le cadre de ce programme a permis de montrer que certaines pratiques testées avaient une influence pour limiter l'expression de l'eutypiose. Le système de taille en cordon qu'il soit simple ou bilatéral a favorisé son expression (Figure 7). Concernant l'esca/BDA, les résultats étaient variables d'une situation à l'autre et il est ainsi difficile de tirer une conclusion quant à l'influence de la taille, de la densité et de l'aménagement des coteaux sur ces maladies (résultats divergents entre les sites).

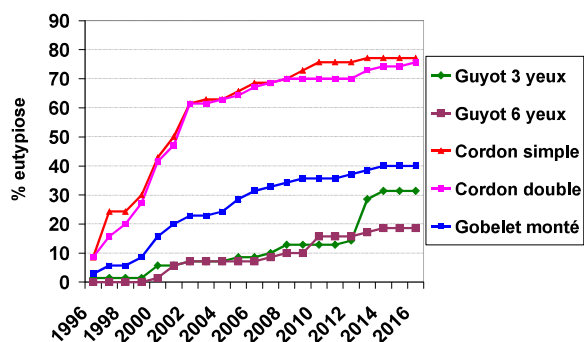


Figure 7 : Evolution du taux de ceps atteints d'eutypiose (%) en fonction du système de taille (site de Liergues)

5. Stratégies pour limiter la présence des champignons associés aux maladies du bois dans les plants issus des pépinières

Les travaux réalisés ces dix dernières années avec l'appui des pépiniéristes ont montré que la plupart des champignons se propagent par les bois de porte-greffe et de greffons (Larignon et al., 2006) et contaminent le matériel végétal durant trois phases de la fabrication des plants : la réhydratation des boutures, la stratification et l'élevage en serre ou au champ (Larignon et al., 2006, Viguès et al., 2008). Les sources d'inoculum, responsables des contaminations ont

été en partie identifiées grâce à des outils moléculaires (PCR), elles sont situées à la surface du matériel végétal (Larignon et al., 2009). Pour obtenir des plants moins porteurs, voire exempts de champignons associés aux maladies du bois, l'IFV a étudié l'impact de plusieurs stratégies : la désinfection du matériel végétal lors de la réhydratation des bois de façon à réduire les contaminations lors des étapes de fabrication des plants, le choix du matériel végétal lors de la collecte des bois et un nouveau système de production (greffes-boutures herbacées). Parmi les méthodes de désinfection du matériel végétal testées par l'IFV (Viguès et al., 2010), qu'elles soient chimiques, biologiques ou physiques, seul le traitement à l'eau chaude utilisé dans les conditions de la Flavescence dorée (45 min, 50°C) a partiellement donné de bons résultats (sur certaines espèces fongiques seulement) lorsque celui-ci était réalisé sur les plants en sortie de pépinière. Il avait été montré aussi dans le cadre du programme Casdar V905 (2010-2012) que des plants n'hébergeant pas les champignons pathogènes en sortie de pépinière pouvaient être obtenus par l'utilisation de greffes-boutures herbacées (Larignon et al., 2013). Ces deux stratégies ont été testées dans les conditions du vignoble dans le cadre de ce programme, afin de déterminer si la production de plants indemnes de champignons pathogènes ou faiblement contaminés permettrait de limiter le développement des maladies du bois (esca, BDA). Enfin, l'impact de la qualité du matériel végétal à l'entrée de la pépinière a été aussi mesuré, afin d'évaluer l'intérêt de différentes préconisations concernant les vignes-mères sur la qualité des plants avant leur commercialisation.

5.1 Evaluation de l'efficacité du traitement à l'eau chaude

Le suivi annuel de quatre parcelles à partir de 2006 ou 2007 jusqu'en 2013 a permis d'évaluer l'effet du traitement à l'eau chaude effectué dans les conditions utilisées pour la Flavescence dorée sur le matériel végétal (greffons et bois de porte-greffe) ou les plants en sortie de pépinière sur l'extériorisation de l'esca ou du BDA. Ces parcelles avaient été initialement mises en place par l'INRA de Dijon pour évaluer l'efficacité de ce traitement à l'égard de la Flavescence dorée et connaître son innocuité vis-à-vis du taux de reprise des plants. En Bourgogne, le suivi annuel des deux parcelles plantées en 1995 et 1996 (chardonnay/3309C, Pinot noir/3309C), dont les plants ont été traités en sortie de pépinière par l'ex-ENTAV et provenant au total de cinq pépiniéristes, montrent que le traitement à l'eau chaude n'a aucune influence sur le pourcentage d'extériorisation de symptômes d'esca/BDA (Figure 8A). De la même manière, il ne montre aucun effet lorsque le traitement a été effectué sur le matériel végétal avant greffage, comme le montre le suivi annuel de deux parcelles (Pinot noir/3309C, Chardonnay/3309C) plantées en 2000 dans le Languedoc-Roussillon (Figure 8B).

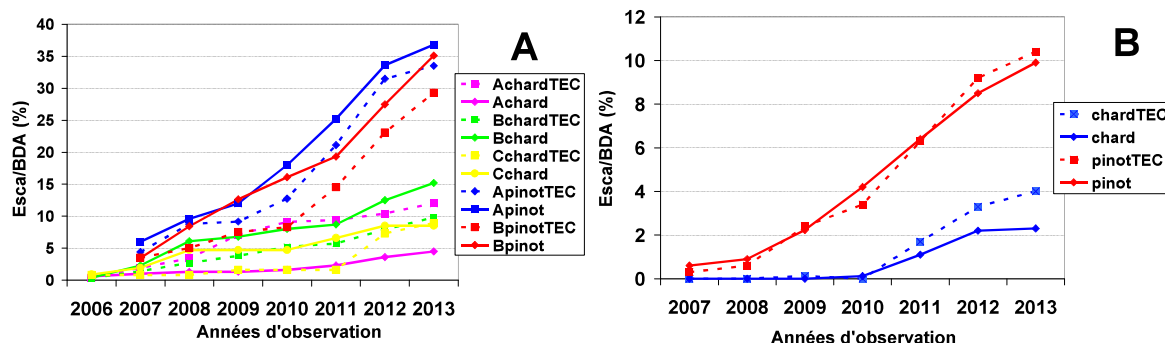


Figure 8 : Effet du traitement à l'eau chaude effectué sur les plants en sortie de pépinière (A) sur les parcelles de Chardonnay (en mauve, vert et jaune) et de Pinot noir (en rouge et bleu) situées en Bourgogne, et sur les greffons et bois de porte-greffes (B) sur les parcelles de Chardonnay (en bleu) et de Pinot noir (en rouge) situées dans le Languedoc-Roussillon. Un cep jugé malade est par la suite toujours comptabilisé à partir de l'année d'expression jusqu'à la dernière année d'observation.

5.2. Evaluation de la technique de greffes-boutures herbacées

Pour évaluer l'efficacité d'un tel mode de production sur les maladies du bois, une parcelle de Sauvignon blanc /110R a été implantée en 2013 dans le vignoble de Gaillac. Elle met en comparaison des plants issus de greffages herbacés, totalement exempts de champignons pathogènes comme cela a été vérifié par analyses microbiologiques, et des plants issus du même matériel végétal produits en pots de manière classique par greffages ligneux (témoins) et largement porteurs des champignons cibles, en particulier les *Botryosphaeriaceae* (Figure 9). L'évaluation s'est tout d'abord basée sur des analyses microbiologiques réalisées pendant trois années consécutives après la plantation (2014 à 2016) selon la méthode de Larignon et Dubos (1997) à partir du matériel végétal prélevé (baguette, tronc). Ces analyses ont montré une contamination rapide des greffes-boutures herbacées par les *Botryosphaeriaceae*, le pourcentage de plantes contaminées devenant similaire à celui des plantes témoin tant au niveau des écorces que dans les tissus ligneux (Figure 9).

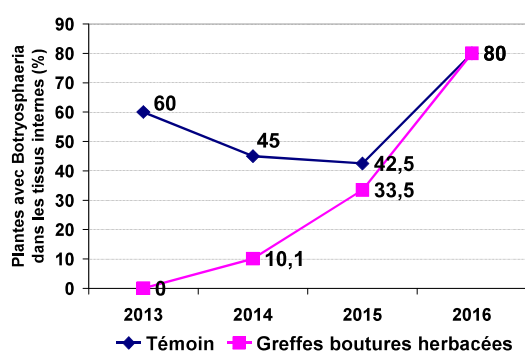


Figure 9 : Evolution de la contamination des plants par les *Botryosphaeriaceae* au niveau des tissus ligneux internes.

L'évaluation d'un tel procédé sera ultérieurement basée sur l'extériorisation des symptômes sur cette parcelle, les symptômes apparaissant en principe sur des vignes âgées de 7 – 8 ans. *In fine*, cette étude devrait permettre de conclure sur l'intérêt ou non de produire des plants indemnes des champignons en sortie de pépinière.

5.3. Le choix du matériel végétal lors de la collecte des bois

La production de plants moins atteints par les champignons inféodés aux maladies du bois pourrait être améliorée par le choix du matériel végétal à l'entrée de la pépinière. Cette stratégie a été évaluée dans deux régions viticoles (Sud-Ouest, PACA) en 2013 sur des parcelles de vignes-mères de porte-greffes ou de greffons dont l'état sanitaire a été caractérisé (taux de mortalité, taux d'expression d'esca/BDA). En région PACA, la collecte a consisté à prélever au hasard quatre-vingt sarments sans distinction de l'état sanitaire du cep pour chacune des cinq parcelles de vignes-mères de greffon de Cabernet-Sauvignon (date de plantation allant de 1978 à 2007) dont le taux d'expression de maladies variait entre 0,7 % et 18,1 %, et des six parcelles de vignes-mères de porte-greffe de 110 Richter dont le taux de mortalité allait de 0 à 23 % (date de plantation de 1978 à 2007). Pour la région Sud-Ouest, cent sarments exprimant des symptômes des maladies du bois et cent sans symptôme apparent ont été prélevés pour chacune des huit parcelles de vignes-mères de greffon de différentes variétés (Sauvignon blanc, Mauzac, Duras, Fer Servadou, Cabernet-Sauvignon) (date de plantation de 1987 à 2006) dont le taux d'expression variait entre 0 % et 18,8 %. Les analyses microbiologiques effectuées sur les écorces et à l'intérieur des tissus ligneux selon la méthode de Larignon et Dubos (1997) sur ce matériel végétal ne révèlent aucune différence concernant le pourcentage de greffons ou de bois de porte-greffe contaminés par les *Botryosphaeriaceae* entre les parcelles exprimant fortement ou peu les maladies du bois (Figure 10A et B) ou

montrant des taux de mortalité de différents degrés. La figure 10B montre aussi que les champignons sont autant trouvés sur les sarments malades ou non.

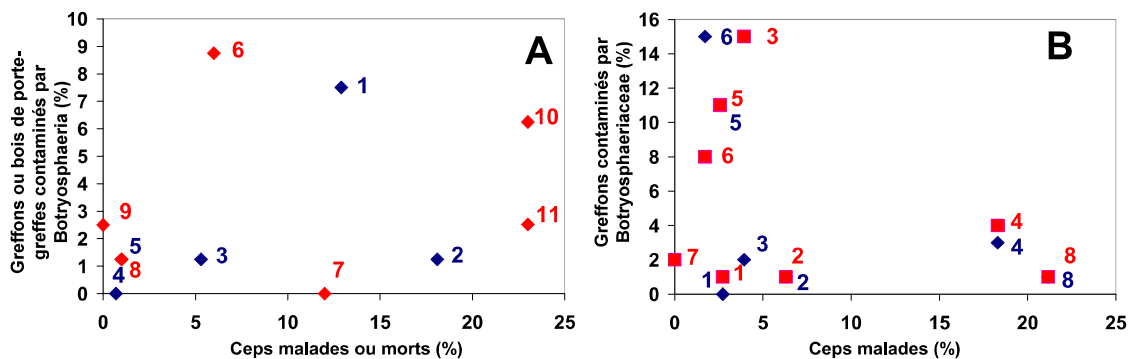


Figure 10 : (A) Relation entre le pourcentage de ceps malades ou de mortalité et le pourcentage de greffons ou de bois de porte-greffe contaminés par les *Botryosphaeriaceae* (PACA). Les chiffres en bleu (1 à 5) correspondent aux parcelles de greffons. Les chiffres en rouge (6 à 11) correspondent à celles de porte-greffe. (B) Relation entre le pourcentage de ceps malades et le pourcentage de greffons apparemment sains (en rouge) ou malades (en bleu) contaminés par les *Botryosphaeriaceae* (Sud-Ouest). Les chiffres correspondent aux huit parcelles étudiées.

6. Discussion et conclusion

Ce programme a apporté de nouvelles informations d'une part sur la description des symptômes d'esca/BDA (identification de l'unité la plus pertinente d'expression, leur apparition par épisodes, le degré d'atteinte des rameaux et son effet sur la mortalité des coursons avec des incidences variant entre les années et les parcelles), et d'autre part sur l'incidence de ces maladies sur la vigueur et la production des ceps. Les conséquences de l'apparition des symptômes foliaires sur la pousse et la production sur le cep sont multiples. Le symptôme foliaire engendre une mortalité de structures de production sur le cep pouvant ou non être compensée par le choix et la charge en bourgeons à la taille ; sur les ceps totalement symptomatiques l'année n, la compensation est rarement intégrale et cet impact se ressent fortement au moins jusqu'à l'année n+2 sur le nombre de coursons en production ; sur les ceps partiellement symptomatiques le remplacement est généralement possible. Il entraîne aussi un retard de la croissance de la pousse printanière sur les coursons symptomatiques uniquement, mais qui n'est pas allée dans nos conditions jusqu'à une atteinte à la biomasse végétative finale du courson suggérant une moins bonne remise en réserve au courson (Duchêne et al., 2003 ; Zapata et al., 2004 ; Bennett et al., 2005). La diminution de réserves carbonées a été mise en évidence par Petit et al. (2006) chez des vignes exprimant des symptômes foliaires. Elle est la conséquence de l'altération de l'appareil photosynthétique et de la transpiration (Petit et al., 2006). Il conduit aussi à une perte de la récolte l'année suivante au courson et au cep suggérant une moins bonne initiation florale des coursons symptomatiques ce qui, comme les retards à la pousse printanière, suggère une conséquence de l'altération de la remise en réserve du fait du symptôme foliaire (Duchêne et al., 2003 ; Bennett et al., 2005), qui, cumulée à la mortalité des coursons, aboutit à une forte baisse de récolte au cep. En l'absence de nouveaux symptômes, les ceps malades l'année n voient leurs performances restaurées (pousses printanières, récolte) l'année n+ 2. Les pertes observées deux années après l'apparition des symptômes ne se voient seulement pour les ceps sur lesquels les structures de production n'ont pas pu être totalement restaurées.

A côté des pertes de récolte que provoquent ces maladies comme cela a été montré par nos travaux, elles engendrent aussi des modifications des propriétés analytiques des moûts après débouillage et des vins. Les vendanges réalisées à partir de raisins prélevés sur des ceps

malades en comparaison à celles effectuées sur des plantes saines conduisent à des teneurs en sucres inférieures dans les moûts et des acidités totales plus élevées. Ces observations sont conformes à d'autres travaux réalisés sur l'esca (Calzarano et al., 2001, 2004 ; Lorrain et al., 2012) et une autre maladie du bois, la Hojã de Malvón (Casassa et al., 2010). Ces différences observées dans les teneurs en sucres s'expliqueraient par une réduction de la migration des hexoses vers les grappes suite à un retard de leur maturation en raison de l'altération de l'appareil photosynthétique. Quant à l'augmentation de l'acidité dans les moûts, elle proviendrait de la plus forte présence d'acide malique dans les raisins qui est liée aussi au retard du mûrissement du raisin. Les teneurs plus élevées d'azote assimilable dans les moûts issus de vignes malades étaient aussi observées par Calzarano et al. (2001, 2004) et Lorrain et al. (2012). Aucune explication n'est aujourd'hui émise pour comprendre l'origine des teneurs élevées d'azote. Des différences sont aussi observées lors des fermentations alcooliques au niveau de leur durée. Elles sont plus rapides en présence de moûts préparés à partir de raisins symptomatiques. Ces disparités sont directement liées aux quantités d'azote assimilable (Bely et al., 1990). Lorsque la composition des moûts est proche de celle de vignes apparemment saines comme en 2016 pour la parcelle de Melon, les cinétiques sont similaires. Enfin, ce travail a mis en évidence des différences dans la composition des vins. Pour ceux issus de récoltes prélevées sur des ceps malades, ils montrent une acidité et des teneurs en certains composés aromatiques plus élevées. Ces résultats vont dans le sens des observations réalisées par Calzarano et al. (2004). Enfin, comme dans le cas des vins issus de mélanges de raisins venant de vignes atteintes par la Hojã de Malvón à hauteur de 10 à 50 % les vins obtenus de vignes symptomatiques ne sont pas toujours les plus dépréciés. Ce travail indique que les effets de la maladie sur la qualité des vins ne sont pas toujours négatifs. Les efforts devront plutôt se porter sur le maintien de la production que d'améliorer leur qualité.

Pour les travaux réalisés sur le cycle biologique des *Botryosphaeriaceae*, ils apportent de nouvelles informations et complètent des travaux réalisés auparavant qui portaient sur la dissémination aérienne ou l'identification de la voie de pénétration de ces champignons dans la plante. Il avait été montré que *D. seriata* se disséminait surtout pendant la période végétative (Kuntzmann et al., 2009) et contaminait les plaies de taille durant cette même période (Larignon, 2011), mais ces études n'avaient pas permis de montrer que ces contaminations conduisaient à une infection. Les résultats obtenus dans le cadre de ce programme indiquent que la phase hivernale n'est pas une période cruciale pour la lutte à l'égard de ces champignons car la plante n'y est pas sensible. La phase végétative, notamment à partir de la floraison, est au contraire une période critique. Des observations réalisées dans le vignoble vont dans le sens de ces résultats, il avait été observé que ces champignons étaient aptes à envahir les tissus ligneux à partir de blessures formées lors d'opérations en vert (Molot et al., 2006).

La lutte devrait ainsi s'effectuer durant cette période ou être anticipée par exemple en éradiquant les sources d'inoculum ou les limitant fortement au niveau des plaies de taille et des coursons pour les rendre en dessous du seuil de nuisibilité, comme le faisait l'arsénite de sodium, produit appliqué sur toute la plante au plus tard quinze jours avant le débourrement (Larignon, travaux AAP Casdar V1301). Tant que l'origine de la présence des *Botryosphaeriaceae* dans les premiers entre-nœuds des rameaux et la période à laquelle ils sont contaminés ne seront pas connues, il sera difficile de trouver des stratégies efficaces pour empêcher ou limiter leur développement. Pour commencer à apporter une réponse sur l'origine de ces champignons dans ces tissus, des outils ont été mis au point ou en train d'être finalisés (outil infraspécifique des *Botryosphaeriaceae*, hybridation *in situ*) lors de ce programme.

Les *Botryosphaeriaceae* sont souvent trouvés sur les sarments laissés au sol comme le montrent les études réalisées sur l'identification des sources d'inoculum. Ces observations confortent d'autres travaux (Elena et Luque 2015). L'enlèvement de ces sarments pourrait être suggéré comme une pratique qui permettrait de diminuer l'inoculum. Cependant, avant de préconiser une telle méthode, il faudrait connaître le poids de cet inoculum par rapport à celui situé sur la plante elle-même. Pour cela, il faudrait mener des enquêtes plus approfondies de façon à définir le seuil de nuisibilité.

La présence des *Botryosphaeriaceae* dans les rameaux apparemment sains et surtout dans les rameaux malades comme le montrent nos travaux ou ceux d'Epstein et al. (2008) nous interrogent aussi sur les interactions qui existent à ces niveaux entre la plante et ces champignons, et celles avec le microbiote pour lequel peu d'information existe à ce jour. Les événements conduisant le passage d'un état asymptomatique à un état malade sont peu connus. Ces événements dépendent de l'état de sensibilité de la plante qui est liée, entre autres, au stade phénologique et à sa charge, comme le montrent nos travaux. La période située entre la floraison et la véraison est la plus sensible (Spagnolo et al., 2014) et une plante pour laquelle les inflorescences ont été enlevées dès leur apparition l'est moins (Spagnolo et al., 2017). Cette sensibilité serait liée à l'état physiologique de la vigne caractérisé par l'inhibition de certaines réponses de défense et une induction du métabolisme primaire. Une charge importante a déjà été considérée comme un facteur important de stress chez le pacanier atteint par le « shoot dieback » (Reilly et al., 2010) associé aux *Diaporthe/Botryosphaeria*.

Les travaux réalisés dans ce programme ont concerné également l'évaluation de certains facteurs agronomiques sur le développement des maladies du bois. L'évolution de telles maladies peut être en effet accélérée ou ralentie selon la conduite de la vigne choisie par le viticulteur (choix du porte-greffe et du cépage, préparation et entretien du sol, systèmes de taille, entretien de la végétation, maîtrise des maladies, mécanisation) et le climat agissant sur le fonctionnement de la plante, la vie des agents pathogènes et du microbiote environnant. Plusieurs facteurs environnementaux sont actuellement connus pour influencer sur l'extériorisation des symptômes comme par exemple, la sensibilité du cépage, les sols à forte réserve utile et/ou ayant un statut azoté élevé et la vigueur (Bertsch et al., 2013). L'étude effectuée dans le cadre de ce programme s'est plutôt orientée sur l'effet de modes de conduite sur ces maladies. Parmi les pratiques évaluées, la densité de plantation, l'aménagement de coteaux et les systèmes de taille, seule la dernière a une influence sur l'eutypiose. Certains systèmes de taille limitent ou retardent cette affection. Cette observation avait déjà été rapportée dans le vignoble cognaçais (Dumot et al., 2004). Pour l'esca/BDA, la situation semble avoir plus d'importance que les pratiques testées car les résultats sont variables d'un site à un autre.

Enfin, la dernière action menée dans le cadre de ce programme a permis d'évaluer plusieurs stratégies qui permettraient de limiter la présence des champignons associés aux maladies du bois dans les plants issus des pépinières (traitement à l'eau chaude, greffes-boutures herbacées, choix du matériel végétal à l'entrée de la pépinière). En conclusion de ce travail, sur deux aspects, et malgré les espoirs de prophylaxie qui pouvaient naître des connaissances sur les contaminations du matériel végétal, les résultats ont montré :

- qu'aucune modification du statut sanitaire des plants ne peut être espérée par la mise en œuvre de mesures de sélection, même drastiques, des boutures, greffons et porte-greffes. Ce travail indique que le déclassement éventuel d'une parcelle pour la production de matériel végétal en raison de ses taux élevés de mortalité ou de maladie ne semble pas nécessaire. Il ne paraît pas utile non plus de marquer les ceps malades pour éviter de prélever les greffons selon ces études car les champignons sont autant trouvés sur les sarments malades ou non. Ce travail conforte les résultats déjà obtenus dans le cadre de l'appel à projet Casdar V905 (2010-

2012), qui avait montré que le choix du prélèvement du matériel végétal sur les vignes-mères de greffons ou de porte-greffes n'influe pas sur la qualité des greffes boutures après la sortie de stratification ou en sortie de pépinière.

- que la production de plants totalement exempts de champignons pathogènes ne serait vraisemblablement pas non plus significativement efficace dans la lutte contre ces maladies, étant donné les contaminations très rapides constatées sur le matériel. Les champignons proviendraient de parcelles avoisinantes ou d'autres plantes hôtes, il est connu que les champignons associés aux maladies du bois sont rencontrés chez un grand nombre de plantes ligneuses (Farr et Rossman).

En conclusion, pour atteindre notre objectif, proposer des solutions aux Professionnels, il est nécessaire de poursuivre certains de ces travaux. Ils doivent impérativement porter sur i) le cycle biologique, notamment l'identification des portes d'entrée des *Botryosphaeriaceae* dans la plante et la détermination de leur seuil de nuisibilité, ii) la compréhension du basculement de l'état asymptomatique vers l'état symptomatique en étudiant les interactions *Botryosphaeriaceae* – plante et enfin iii) l'identification des facteurs favorisant ou inhibant leur développement dans la plante et ainsi l'expression de la maladie.

Remerciements

Nous tenons à remercier la Chambre d'agriculture de la Loire-Atlantique pour le suivi des parcelles en Val de Loire qui ont été utilisées dans le cadre des expérimentations menées en œnologie, l'EPLEFPA de Nîmes - Rodilhan pour le prêt des parcelles utilisées dans le cadre de l'étude sur le cycle biologique et enfin FranceAgriMer pour l'aide financière.

Références bibliographiques

- Bely M., Sablayrolles J.M., Barre P., 1990. Automatic control of assimilable nitrogen addition during alcoholic fermentation in enological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 70,1-6.
- Bennett J., Jarvis P., Creasy G.L., Trough M., 2005. Influence of defoliation on overwintering carbohydrate reserves, return bloom, and yield of mature Chardonnay grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture* 56, 386-393.
- Berstch C., Ramirez-Suero M., Magnin-Robert M., Larignon P., Chong J., Abou-Mansour E., Spagnolo A., Clément C., Fontaine F., 2013. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood syndromes. *Plant Pathology* 62, 243-265.
- Billones-Baijens R.G., 2011. *Botryosphaeria* infections in New Zealand grapevine nurseries: Sources of inoculum and infection pathways. PhD, Université de Lincoln, Nouvelle-Zélande. 264 pages.
- Calzarano F., Cichelli A., Odoardi M., 2001. Preliminary evaluation of variations in composition induced by esca on cv. Trebbiano d'Abruzzo grapes and wines. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S443-S448.
- Calzarano F., Seghetti L., del Carlo M., Cichelli A., 2004. Effect of esca on the quality of berries, musts and wines. *Phytopathologia Mediterranea* 43, 125-135.
- Casassa F., Sari S., Avagnina S., Longone V., Césari C., Escoriaza G., Catania C., Gatica M., 2010. Effects of 'hoja de malvón. *International Journal of Wine Research* 1, 63-73.
- Coarer M., Bredoux M.C., Le Clinche C., Coulon T., Daniel P., 1999. Identification génétique de *Botrytis cinerea* par RAPD : évaluation de la diversité des populations en Pays nantais et Bordelais. Actes du VI^{ème} symposium international d'œnologie. Editions Tec & Doc, Paris, 82-86.
- Duchêne E., Monamy C., Langellier F., Jaegli N., Salber R., Meluc D., Panigai L., 2003. Incidence au vignoble des conditions de maturation sur l'élaboration du rendement au cours de la saison suivante. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 37, 103-116.

- Dumot V., Ménard, E., Courlit, Y., Ouvrié, M., Desaché F., Boursier N., David S., Dubos B., Larignon P., 2004. L'eutypiose en Charentes. Résultats de dix ans d'étude sur Ugni blanc. *Phytoma* 568, 4-7.
- Epstein L., Kaur S., van der Gheynst J.S., 2008. Botryosphaeria-related dieback and control investigated in noncoastal California grapevines. *California Agriculture* 62, 161-166.
- Farr D.F., Rossman A.Y., Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved December 13, 2016, from <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
- Elena G., Luque J., 2016. Pruning debris of grapevine as a potential inoculum source of *Diplodia seriata*, causal agent of Botryosphaeria dieback. *European Journal of Plant Pathology* 144, 803-810.
- Kuntzmann P., Villaumé S., Berstch C., 2009. Conidia dispersal of *Diplodia* species in a French vineyard. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 148-150.
- Larignon P., 2011. Les maladies du bois de la vigne. Quelques éléments sur la biologie de deux champignons associés, *Phaeoacremonium aleophilum* et *Diplodia seriata*. *Phytoma* 646, 41-44.
- Larignon P., 2016. Maladies cryptogamiques du bois de la vigne : symptomatologie et agents pathogènes. <http://www.vignevin.com>, 2^{ème} édition, janvier 2016.
- Larignon P., Dubos B., 1997. Fungi associated with Esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 103, 147-157.
- Larignon P., Dubos B., 2001. The villainy of Black dead Arm. *Wines and Vines* 3, 86-89.
- Larignon P., Berud, F., Girardon K., Dubos B., 2006. Maladies du bois de la vigne. Quelques éléments sur la présence des champignons associés, leur localisation dans le bois et les moments de contaminations. *Phytoma* 592, 14-17.
- Larignon P., Baptiste C., Mallet J.F., Granier J.P., Bloy P., 2013. Greffage en vert, premier test contre les maladies du bois. *Phytoma* 661, 33-35.
- Larignon P., Darné G., Ménard E., Desaché F., Dubos B., 2008. Comment agissait l'arsénite de sodium sur l'esca de la vigne. *Progress Agricole et Viticole* 125, 642-651.
- Larignon P., Coarer M., Larbre C., Girardon K., Viguès V., Yobregat O., 2009. Identification sur le matériel végétal des sources d'inoculum des champignons associés aux maladies du bois. *Phytoma*, 662-623, 46-48.
- Lorrain B, Ky I., Pasquier G., Jourdes M., Guérin-Dubrana L., Gény L., Rey P., Donèche B., Teissedre P.L., 2012. Effect of esca disease on the phenolic sensory attributes of Cabernet-Sauvignon grapes, musts and wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 18, 64-72.
- Lubeck P.S., Alekhina I.A., Lubeck M., Bulat S.A., 1998. UP-PCR genotyping and rDNA analysis of *Ascochyta pisi* Lib. *Journal of Phytopathology* 146, 51-55.
- Molot B., Larignon P., Coarer M., 2006. Black dead arm. De nouvelles pistes. Actes du Colloque Mondiaiviti, Bordeaux, 29-30 novembre 2006. pp 15-17.
- Petit A.N., Vaillant N., Boulay M., Clément C., Fontaine F., 2006. Alteration of photosynthesis in grapevines affected by Esca. *Phytopathology* 96, 1060-6.
- Qiu Y., Steel C.C., Ash G.J., Savocchia S., 2015. Hierarchical genetic variation of Botryosphaeriaceae species associated with decline and dieback of grapevine in south-eastern Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 21, 458-467.
- Reilly C.C., Wood B.W., Stevenson K.L., 2010. Relationship of shoot dieback in pecan to fungi and fruiting stress. *HortScience* 45, 87-91.
- Rey P., Bertsch C., Fontaine F., Larignon P., 2016. Maladies du bois de la vigne. Avancées en France depuis 2010. *Phytoma* 693, 7-10.

Spinosi J, Fevotte J., 2008. Eléments techniques sur l'exposition professionnelle aux pesticides arsenicaux. Matrice cultures – expositions aux pesticides arsenicaux. Institut de veille sanitaire (www.invs.sante.fr).

Spagnolo A., Magnin-Robert M., Alayi T.D., Cilindre C., Mercier L., Schaeffer-Reiss C., Van Dorsselaer A., Clément C., Fontaine F., 2012. Physiological changes in green stems of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay in response to esca proper and apoplexy revealed by proteomic and transcriptomic analyses. *Journal of Proteome Research* 11, 461–75.

Spagnolo A., Larignon P., Magnin-Robert M., Hovasse A., Cilindre C., van Dorsselaer A., Clément C., Schaeffer-Reiss C., Fontaine F., 2014. Flowering as the most highly sensitive period of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv Mourvèdre) to the Botryosphaeria dieback agents *Neofusicoccum parvum* and *Diplodia seriata* infection. *International Journal of Molecular Sciences* 30, 9644-9669.

Spagnolo A, Mondello V, Larignon P, Villaume S, Rabenoelina F, Clément C, Fontaine F., 2017. Defense responses in grapevine (cv. Mourvèdre) after inoculation with the Botryosphaeria dieback pathogens *Neofusicoccum parvum* and *Diplodia seriata* and their relationship with flowering. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 18(2). pii: E393. doi: 10.3390/ijms18020393.

Viguès V., Dias F., Barthélémy B., Yobregat O., Coarer M., Larignon P., 2008. Maladies du bois de la vigne, des étapes à risque identifiées en pépinière. *Phytoma* 621, 30–32.

Viguès V., Yobregat O., Barthelemy B., Dias F., Coarer M., Girardon K., Berud F., Muller M., Larignon P., 2010. Maladies du bois de la vigne, les prévenir en Pépinières. *Phytoma* 638, 27-29.

Zapata C., Deleens E. Chaillou S., Magne C., 2004. Partitioning and mobilization of starch and N reserves in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Plant Physiology* 161, 1031-1040.