HAL
open science

Étude de la microflore colonisant les tissus ligneux de Vitis vinifera : Intérêt pour le développement d'agents de biocontrôle contre une maladie du bois de la vigne, l'esca

Awatef Rezgui

To cite this version:

Awatef Rezgui. Étude de la microflore colonisant les tissus ligneux de Vitis vinifera : Intérêt pour le développement d'agents de biocontrôle contre une maladie du bois de la vigne, l'esca. Mycologie. Université de Bordeaux; Université de Tunis El Manar, 2016. Français. NNT : 2016BORD0449 . tel-02063177v2

HAL Id: tel-02063177

https://theses.hal.science/tel-02063177v2

Submitted on 11 Mar 2019

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.

THÈSE EN COTUTELLE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE TUNIS EL MANAR
ET DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

École Doctorale : Sciences et Technologies du vivant et des Sciences de la Terre
Et École Doctorale : Sciences et Environnements
Spécialité : Ecologie Evolutive, Fonctionnelle et des Communautés

Par
Awatef REZGUI

Étude de la microflore colonisant les tissus ligneux de *Vitis vinifera*: Intérêt pour le développement d'agents de biocontrôle contre une maladie du bois de la vigne, l'esca

The microflora colonizing the wood tissues of *Vitis vinifera* : Development of biocontrol agents against a grapevine trunk diseases (GTDs), Esca

Soutenue publiquement le 20 décembre 2016 devant le jury d'examen composé de :

Mr Aly RAIES, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis	Président et Examinateur
Mr Naceur DJEBALI, Maître de Conférences au Centre de Biotechnologie de Bordj-Cédria	Rapporteur
Mr Rémy GUYONEAUD, Professeur à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour	Rapporteur
Mr Aziz AZIZ, Maître de Conférences à l'Université de Reims et Champagne-Ardenne	Examinateur
Mr Patrice REY, Professeur à l'Université de Bordeaux	Co-Directeur de thèse
Mme Najla SADFI, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis	Co-Directeur de thèse

Dédicace

Mon papa aimé, mon papa à moi, l'amour de ma vie

Toi qui me fais bondir sur tes genoux comme un chamois

Toi mon brave, mon roi, le plus beau des hommes

Que pourrais-je te dire ?

Que tu ne sais déjà ?

Même si tu n'es plus là, ton âme sait ce que ta petite fille est devenue, la volonté d'honorer ta mémoire me guide et illumine mon chemin

Je te dédie cette mémoire « Barhomti ;)»

Ta petite gamine, ta joie devenu docteur « Doctoura »

Je n'ai jamais oublié ma promesse habibi

Papa je te promis de le faire et je le fais mon homme ;)

Je dédie mon travail spécialement à la plus généreuse de toutes les mamans à toi «khadouja» pour ta bonté et ton amour, ta générosité et ta sagesse, je ne saurais exprimer ma gratitude envers tes sacrifices pour moi, que dieu te garde parmi nous le plus longtemps possible.

Mes chers frères « RM3, Mahoura, Sousou » et mes sœurs « ILKA, Fafa », mes neveux « ROUSTI2, YoYo » et ma petite nièce Myra, mes beaux-frères Abdo, Mohsen, Nanousti à vous je dédie cette mémoire de thèse

Dali, la lumière qui illumine mon chemin, mon homme, mon cœur à toi je dédie cette mémoire, merci chéri pour ta patience pour tes encouragements, pour être toujours présent à mes côtés

Mes amis ou plutôt ma famille internationale, merci pour tous les bons moments qu'on a partagé ensemble, merci pour votre soutien, pour votre aide

Aboura, Afef, Ahmed « Abou OMAR », Amina, Amira, Annibal, Aurélia, Carito polola mia, CélinA, Elhem, Eloïse2, Elisa ZAZA, Eugenia acha, Evlyne, FranklinA, Genarito Tiramissu « G1 », GerardITO tortilla « G2 », Gost &Will, Iby, Jason, Javid Mualim, Nadhem oe Mario, Joelle, JuanA, Julia, Marwa3, Mama Esabelle, Mayssa, Nada, Natha la guapa, Nicolas pololo, NoeliTA hermanita, Nourchène, Rami, Rana « Om Jadou », Rawdha, Saida, ToniTo oe papa,Willy,

Remerciements

En premier lieu, je tiens à exprimer mes profonds remerciements à mes directeurs de thèse Mr Patrice REY et Mme Najla SADFI-ZOUAOUI qui m'ont soutenue tout au long de ces trois années de thèse. Patrice, mon chef ;) je suis très reconnaissante pour l'aide continuelle que tu m'as apportée et pour ton encouragement à mener au terme de ma thèse. Merci pour ta confiance que tu m'as accordée. Merci Mme Najla de m'offrir l'opportunité de découvrir le monde de recherche scientifique, ces grâces à vous cours pertinents durant mon parcours de mastère que j'ai décidé de commencer ma belle aventure avec la lutte biologique.

Je tiens à remercier spécialement Jessica VALLANCE, Emilie BRUEZ et Asma BEN GHNAYA CHAKROUN, pour tout l'effort que vous fournissez à mon égard, ma belle Jessica, tous les mots ne peuvent pas exprimer ma reconnaissance à tout l'effort que t'as fournie pour me diriger et m'aider à finaliser cette thèse. Emilie, la plus belle, merci beaucoup pour tes conseils, tes encouragements et ton aide surtout en analyse statistique, c'est promis on aura un couscous à la fin de cette thèse. Asma, t'es plus qu'une encadrante pour moi, t'es ma sœur qui m'a toujours soutenue et m'a aidée à surmonter tous les obstacles par tes conseils, tes mots douces, que dieu te garde pour tes petites « Saroura & Cyrine »

Je voudrais aussi remercier Monsieur Ali RAIES, Professeur à la faculté des sciences de Tunis El Manar pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider et d'examiner ma mémoire et d'évaluer ce travail.

Mes remerciements s'adressent aussi aux rapporteurs : Mr Naceur DJEBALLI, Maître de conférence au Centre de biotechnologique de Bordj Cedria, Mr Remy GUYONEAUD, Professeur à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour et à l'examinateur Mr Aziz AZIZ, maître de conférence à l'Université de Reims et Champagne-Ardenne pour le grand honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'examiner mon travail qui, par leurs critiques et appréciations, ne pourront que l'enrichir.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du l'UMR, Santé et Agroécologie du Vignoble à INRA Bordeaux. Je tiens à remercier Denis THIERY, le directeur de l'UMR, pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire. L'échantionnage a été réalisé au sein de laboratoire Microorganisme et biomolécule active, je tiens à remercier Mr Abdelattif BOU DABOUS le directeur de laboratoire.

Je remercie également les financeurs de ce projet : le ministère Français de l'agriculture (projet CASDAR V1302), Le Projet agroécologique PAL, l'Organisation internationale de vigne et du Vin (OIV) et le projet CMCU Phc Utique n° 13G0924.

Je tiens à remercier Mr Javid OJAGHI, pour son aide en analyse statistique, pour sa sympathie et tous les bons moments qu'on a partagé ensemble. Javid, merci beaucoup pour tes conseils précieux et toutes les « Güzel cultures » que tu m'as montrés !

Je voulais remercier spécialement Mr Mokhtar DRIDI, grâce à lui j'ai fait l'échantillonnage de mes ceps de vignes et j'ai commencé ma belle aventure avec les maladies du bois de la vigne.

Je dis un grand merci à mes collègues du bureau pour votre soutien et vos encouragements c'était une chance d'être avec vous. Anthony, Chloé, Jonathan, merci beaucoup pour votre patience et vos conseils. C'était un plaisir d'être avec vous durant toute cette période.

Je tiens à remercier toutes les personnes de l'UMR SAVE qui ont contribué à la réalisation de ce travail. La très bonne humeur et l'ambiance au sein du groupe m'ont permis de mener mes travaux de recherche de façon très agréable. Gilou, merci pour ton coup de main lors des expérimentations en serre, grâce à toi j'ai réalisé mes essais de protection. Seb, merci pour tout le maintien que t'as donnée à mes plantes surtout qu'on tout le monde part en vacances ;).

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ACP : Analyse en Composantes Principales

AOC : Appellation d'origine contrôlée

BDA : Black Dead Arm (chancre à Botryosphaeriaceae)

cm : Centimètre

CTAB : Céthyl triméthyl-ammonium bromide

cv : Cultivar

DO : Densité optique

e.g : *exempli gratia* **-** Par exemple

h : Heure

ha : Hectare

i.e : *id est* - C'est-à-dire

J : Jour

MA : Malt Agar

MDB : Maladies Du Bois

mm : Millimètre

pb : Paire de bases

PDA : Potato Dextrose Agar

PDB : Potato Dextrose Broth

pH : Potentiel d'hydrogène

rpm : Tours par minute

SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism

TSA : Tryptic Soy Agar

TSB : Tryptic Soy Broth

V : Volume

Sommaire

Dédicace

Remerciement

Liste des abréviations

Résumé

Abstract

Introduction générale 1

Synthèse bibliographique 3

1. Histoire de la vigne 3

1.1 Histoire de la vigne en Tunisie 3

2. Présentation de l'espèce végétale 5

2.1 Description et classification botanique de *Vitis vinifera* 5

2.2 Le cycle de développement de la vigne 7

2.2.1 Le cycle végétatif 7

2.2.2 Le cycle reproducteur 8

2.3 Les exigences climatiques de la vigne 9

2.3.1 La lumière 9

2.3.2 La température 9

2.3.3 L'eau 9

2.3.4 Le vent 10

2.4 Intérêt économique de la vigne 10

3. Importance de la viticulture 11

3.1 Dans le monde et en France 11

3.1.1 Evolution de la superficie viticole mondiale 11

3.1.2 Production viti-vinicole mondiale 12

3.2 Superficie et production viticole tunisienne 14

3.2.1 Le vin 14

3.2.2 Les raisin de table 17

4. Les maladies de la vigne 17

4.1 Les maladies cryptogamiques aériennes de la vigne 19

4.1.1 Le mildiou-*Plasmopara viticola* 19
4.1.2 L'oïdium-*Erysiphe necator* 21
4.1.3 La pourriture grise et pourriture noble– *Botrytis cinerea* 21
4.2 Méthodes de protection vis-à-vis des maladies cryptogamiques aériennes 23
4.2.1 La lutte prophylactique 23
4.2.2 La lutte chimique 24
4.3 Les maladies du bois de la vigne 25
4.3.1 L'esca 26
4.3.1.1 Historique 26
4.3.1.2 Etiologie 26
4.3.2 Le Black Dead Arm (BDA) 28
4.3.2.1 Historique et symptômes 28
4.3.2.2 Etiologie 29
4.3.3 L'Eutypiose - *Eutypa lata* 30
4.3.3.1 Historique et symptômes 30
4.3.3.2 Etiologie 31
5. Les stratégies de lutte contre les maladies du bois de la vigne 31
5.1 La lutte culturale 31
5.2 La lutte chimique 32
5.3 La lutte biologique 33
5.3.1 Agents de lutte biologique 33
5.3.1.1 Les substances naturelles 33
5.3.1.2 Champignons et oomycètes 34
5.3.1.3 Les bactéries 35
Objectifs 38
Matériels et méthodes 39
1. Matériel végétal et échantillonnage 39
1.1 Au vignoble Tunisien 39
1.2 En conditions contrôlées 40
2. Etude des communautés microbiennes par Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) 41
2.1 Extraction de l'ADN 41

2.2 Analyses SSCP 42
3. Isolement et caractérisation des micro-organismes colonisant les tissus ligneux de la vigne 43
3.1 Isolement et purification 43
3.2 Identification moléculaire par séquençage 44
3.2.1 Extraction d'ADN des souches pures 44
3.2.2 Amplification et séquençage 44
3.3 Caractérisation physiologique, biochimique, moléculaire et métabolique des bactéries et champignons isolés de la vigne 45
3.3.1 Les champignons endophytes 45
3.3.1.1 Caractérisation physiologique, effet de la température sur la croissance mycélienne 45
3.3.1.2 Compétition *in vitro* entre les trois phytopathogènes *Lasidiodiplodia pseudotheobromae*, *Neofusicoccum parvum* et *Schizophyllum commune* 46
3.3.2 Les bactéries endophytes 46
3.3.2.1 Caractérisation biochimique 46
3.3.2.2 Détection des gènes codant pour deux familles d'antibiotiques 47
3.3.2.3 Caractérisation métabolique par des plaques Biolog EcoPlate™ 48
3.3.2.4 Etude des facteurs pour la promotion de croissance des plantes 48
3.3.2.4.1 Détection de la production de sidérophores 48
3.3.2.4.2 Solubilisation du phosphate 49
3.3.2.5 Caractérisation biologiques: test d'hypersensibilité sur tabac 49
3.3.2.6 Test de confrontations *in vitro* entre les bactéries endophytes et les trois pathogènes fongiques *L. pseudotheobromae*, *N. parvum* et *S. commune* isolés de ceps tunisiens 49
4. Essais réalisés *in planta* 50
4.1 Test de pathogénicité de *L. pseudotheobromae*, *N. parvum* et *S. commune* sur des boutures cv. Muscat d'Italie 50
4.2 Test de protection *in planta* 51
4.2.1 Les agents pathogènes fongiques 51
4.2.2 Les bactéries antagonistes 51
4.2.3 Inoculation des boutures de vigne sous serre 52

Résultats et Discussion 55
Chapitre 1. Caractérisation d'agents pathogènes du bois des ceps de vigne dans le Nord de la Tunisie 55
1. Introduction 56
2. Objectif 56
3. Résultats 57
3.1 Etat sanitaire des parcelles de vigne : prospection et échantillonnage 57
3.2 Isolement de *Lasidiodiplodia pseudotheobromae, Neofusicoccum parvum* et *Schizophyllum commune* dans le Nord de la Tunisie 58
3.3 Aspect macroscopique des trois souches fongiques impliquées dans l'esca *i.e Neofusicoccum parvum, Lasidioplodia pseudotheobromae* et *Schizophyllum commune* 58
3.4 Effet de la température et de la durée d'incubation sur la croissance radiale des trois pathogènes fongiques isolés 60
3.5 Test d'antagonisme *in vitro* entre les trois pathogènes fongiques isolés .. 61
3.6 Mise en évidence des nécroses induites chez la vigne suite à l'attaque artificielle par *N. parvum, L. pseudotheobromae* et *S. commune* et vérification du Postulat de Koch 61
4. Discussion 65
Chapitre 2. Etude de la microflore bactérienne bénéfique colonisant le bois des ceps de vigne plantés dans le Nord de la Tunisie 69
1. Introduction 70
2. Objectifs 70
3. Résultats 70
3.1 Analyse globale des communautés bactériennes colonisant les tissues ligneux des ceps de vigne tunisiens par SSCP 70
3.2 Caractérisation des souches bactériennes isolées des différents échantillons de bois 72
3.3 Dégradation de sources carbonées par les bactéries isolées (Biolog EcoPlate™) 75
3.4 Caractérisation biologiques des bactéries isolées : test d'hypersensibilité sur tabac 75

3.5 Antagonisme *in vitro* entre les bactéries isolées et trois pathogènes fongiques, *i.e. L. pseudotheobromae, N. parvum* et *S. commune* 75
4. Discussion 77
Chapitre 3. Essai de protection *in planta* des ceps de vignes cv. Cabernet Sauvignon et Muscat d'Italie contre l'attaque de *Neofusicoccum parvum* et *Phaeomoniella chlamydospora* 81
1. Introduction 82
2. Objectifs 82
3. Résultats 83
3.1 Mise en évidence des lésions externes et internes induites chez la vigne suite à l'attaque artificielle par les deux champignons *N. parvum* et *P. chlamydospora* 83
3.2 Effet des bactéries antagonistes sélectionnées sur la réduction des nécroses causées par *N. parvum* 85
3.3 Effet des bactéries antagonistes sur la réduction des nécroses internes causées par *P. chlamydospora* 87
3.4 Comparaison de l'efficacité des antagonistes biologiques à réduire les nécroses internes en fonction des cultivars traités 87
3.5 Effet des traitements antagonistes sur les communautés bactériennes et fongiques des tissus ligneux des boutures de vigne 88
3.5.1 Influence de la co-inoculation de deux souches bactériennes avec *N. parvum* sur les microbiotes bactérien et fongique 88
3.5.2 Influence de la co-inoculation de deux souches bactériennes avec *P. chlamydospora* sur les microbiotes bactérien et fongique 90
4. Discussion 91
Conclusion générale et perspectives 95
Références bibliographiques 100
Webographie 114
Valorisation des résultats

Liste des tableaux

Tableau1. Superficie des principaux pays viticoles en 2014 dans le monde (source OIV). ... 11

Tableau 2. Production de vin à l'échelle mondiale en Mhl (OIV, 2015) 14

Tableau 3. Liste des variétés de vigne autochtones cultivées en Tunisie (Zoghlami et *al*., 2001, 2009, Ghafari et Ferchichi, 2011) 18

Tableau 4. Liste des bactéries antagonistes contre les maladies du bois de la vigne 37

Tableau 5. Caractéristiques des différents vignobles prospectés. Légende : cv : cultivar. 40

Tableau 6. Amorces utilisées pour amplifier les ADN fongique et bactérien. Légende : Amorces marquées en 6-FAM (6-carboxyfluorescéine), (1) White et *al*., 1990,(2) Redford et *al*., 2010..... 42

Tableau 7. Amorces spécifiques pour la recherche des gènes codants aux fengycines A B, D et E et la bacillomycine chez les bactéries endophytes isolées des ceps Tunisiens..... 47

Tableau 8. Origine et identification moléculaire des souches fongiques endophytes isolées à partir des tissus nécrotiques..... 59

Tableau 9. Champignons pathogènes isolés de la zone A « tissus nécrosés » et B « tissus non nécrosés » à partir des 9 traitements entrepris. Légende : *L.P : Lasidiodiplodia pseudotheobromae, N.P : Neofusicoccum parvum, S.C : Schizophyllum commune.* 64

Tableau 10. Description et caractérisation in vitro des souches bactériennes isolées de différents types de bois de ceps tunisiens. BS : bois sain, BN : bois nécrosé, EB : extrémité des bras, cat : catalase, oxy : oxydase, Fe : fengycine et Bacc : bacillomycine 74

Liste des figures

Figure 1. Vendage et vinification en Egypte (A) ; Mosaïque présentant la filière viti-vinicole en Tunisie au musée de Sousse (B) et Uthyne (C). 4

Figure 2. Classification botanique de la vigne selon Simon et *al*. (1977). 6

Figure 3. La vigne est un arbrisseau grimpant (Rezgui, 2013)..... 7

Figure 4. Stades phénologiques repères de la vigne. Débourrement « la vigne pleure » (A), Débourrement « Gonflement de bourgeon » (B), Débourrement « ponte verte » (C), Développement des feuilles (D), Floraison (E, F), Développement des fruits (G) et Maturation des baies (H). 8

Figure 5. Évolution de la superficie viticole mondiale (A ; OIV, 2015). Les dix premiers producteurs mondiale de raisin (B). 12

Figure 6. Principaux pays producteurs de raisin, par type de produits (A). Les 10 premiers pays consommateurs de vin à l'échelle mondiale (B; OIV, 2015)..... 13

Figure 7. Carte présentant les 7 AOC de Tunisie (A ; Poulain d'Andecy, 2012) Taille en gobelet (B, Rezgui, 2013). 15

Figure 8. Production de vins tunisiens (A), quantités de vigne de cuve transformées par région (B) et exportation de vins tunisiens (hL) pour l'année 2015 (C ; http://gifruits.com). 16

Figure 9. Mildiou colonisant la face supérieure de la feuille, aspect en « tâches d'huile » (A), « feutrage blanc » sur la face inférieure (B) visible en début de saison. Symptôme de mosaïque de mildiou sur la face supérieure de la feuille observable en fin de saison (C) et fructifications apparentes de l'oomycète, *Plasmopara viticola,* sur les grappes (D) (Ephytia,INRA). 20

Figure 10 Symptômes d'oïdium. Tâches duveteuses sur la face inférieure (A) et sur la face supérieure de la feuille (B). Symptôme sur feuilles fortement attaquées par l'oïdium (C). Les baies se couvrent d'une poussière blanchâtre (D) (Ephytia, INRA). 22

Figure 11. Symptômes caractéristique de *Botrytis cinerea* sur feuilles, tâches rouges brunes à la périphérie du limbe, (A) et sur grappes qui se recouvrent de conidiophores et prennent une coloration marron (B) (Ephytia, INRA). 23

Figure 12. Symptômes foliaires associées à la forme lente de l'esca sur cépage noir (A) et blanc (B) (Gerbore, 2009). Flétrissement des baies (C, Ephytia INRA). Forme apoplectique (D) (Rezgui, 2013). Nécrose tendre « Amadou » sur bois (E, ephytia, INRA) et sur boite de Petri (F) (Rezgui, 2015). 27

Figure 13. Symptômes foliaires du BDA sur cépages blanc (A) (Rezgui, 2013) et noir (B) (Gerbore, 2009). Bande jaune orangée caractéristique du BDA (C) selon Larignon (2008). 29

Figure 14. Croissance ralentie, entre-nœuds courts et feuilles crispées et chlorotiques caractéristiques de l'eutypiose (A). Nécrose brune sectorielle au niveau du bois (B) (Ephytia, INRA) 30

Figure 15. Mode d'action des bactéries antagonistes contre les attaques des pathogènes fongiques (Compant et *al*., 2013). 35

Figure 16. Sites d'échantillonnage (A). Mode de conduite en pergola haute (B). Filet anti- grêle (C). 39

Figure 17. Calcul du pourcentage de nécroses internes = [taille de nécrose « TN »/taille de sarment « TS »]*100 ; et les deux zones de prélèvements des bûchettes pour la vérification du postulat de Koch. 51

Figure 18. Etapes de la co-inoculation des boutures de vigne par des bactéries antagonistes et des pathogènes fongiques (A) et mesure des nécroses internes (B). Perçage de la bouture (A1), inoculation par 40 µl de suspension bactérienne (A2), inoculation par un disque fongique de l'un des deux champignons (A3, 4), protection de la zone d'inoculation par du parafilm (A5). 54

Figure 19. Les différents symptômes de la maladie de l'esca observés dans la région de Mornag : Forme apoplectique (A). Symptômes caractéristiques sur feuilles (B). Nécrose centrale brune caractéristique de l'esca (C)..... 58

Figure 20. Aspect macroscopique de trois champignons, *i.e. N. parvum* (A), *L. pseudotheobromae* (B) et *S. commune* (C), impliqués dans les maladies du bois de la vigne après 3 (A1, B1, C1) et 7 jours d'incubation (A2, B2, C2) à l'obscurité à 25°C sur milieu MA. 59

Figure 21. Croissance mycélienne (en mm) des 3 champignons *N. parvum* (N.P), *L. pseudotheobromae* (L.P) et *S. commune* (S.C) incubés à différentes températures après 24, 48, 72 et 96 heures. 60

Figure 22. Intensité de colonisation en pourcentage de *N. parvum* (A), *L. pseudotheobromae* (B) et *S. commune* (C) en double et triple combinaison après 72h d'incubation. Légende : C : Témoin souche pure, LP/NP : effet de LP sur NP en double combinaison, SC/NP : effet de SC sur NP en double combinaison, LP/NP (+SC+LP) : effet de LP sur NP en triple combinaison, SC/NP(LP+SC): effet de SC sur NP en triple combinaison, NP/LP : effet de NP sur LP en double combinaison, SC/LP: effet de SC sur LP en double combinaison, NP/LP (+SC+NP): effet de NP sur LP en triple combinaison, SC/LP (NP+SC): effet de SC sur LP en triple combinaison, NP/SC: effet de NP sur SC en double combinaison, LP/SC: effet de LP sur SC en double combinaison, NP/SC (LP+NP): effet de NP sur SC en triple combinaison et LP/SC (+NP+LP): effet de LP sur SC en triple combinaison. Les histogrammes présentant la même lettre majuscule ou minuscule ne diffèrent pas significativement entre eux, P > 0.05 par le test de Kruskal-Wallis. 62

Figure 23. Pourcentages de nécrose interne induits par *N. parvum* (N.P), *L. pseudotheobromae* (L.P) et *S. commune* (S.C) sur le cultivar Muscat d'Italie. Les barres d'histogramme dont les lettres diffèrent sont statistiquement différentes selon le test de Kruskall-Wallis (P<0.05). Légende : C : contrôle négatif, CP : contrôle négatif percé. 63

Figure 24. Exemples de profils SSCP obtenus à partir d'échantillons de bois sain et nécrosé prélevés dans le bras de ceps de vigne tunisiens 71

Figure 25. Analyse en composantes principales (ACP) des communautés bactériennes colonisant les différents types de bois, *i.e.* bois nécrosé (BN), bois apparemment sain (BS) et extrémité des bras (EB), des ceps de vignes échantillonnés dans le nord de la Tunisie. La variabilité (%) expliquée par chaque axe est indiquée entre parenthèses. Les ellipses correspondent aux intervalles de confiance à 95%. 72

Figure 26. Analyse en composantes principales (ACP) des souches bactériennes isolées des tissus ligneux de ceps de vigne tunisiens en fonction de leurs profils cataboliques obtenus avec des plaques Biolog Ecoplates™. La variation (%) expliquée par chaque axe est indiquée entre parenthèses. Les points représentent la moyenne de trois répétitions pour chaque souche. Les plaques Biolog Ecoplates™ ont été incubées à l'obscurité pendant 48h à 27°C. 76

Figure 27. Effet des isolats bactériens et principalement la souche B6 sur la croissance mycélienne *in vitro* de trois champignons impliqués dans les MDBs : *Neofusicoccum parvum* (A), *Lasidiodiplodia pseudotheobromae* (B) et *Schizophyllum commune* (C). Les données sont les moyennes de 3 répétitions ± l'erreur standard pour chaque souche testée. Les barres d'histogramme avec la même lettre ne présentent pas de différences significatives (P>0.05) d'après le test de Kruskal-Wallis 77

Figure 28. Mise en évidence des nécroses internes et externes respectivement sur boutures de Cabernet Sauvignon (A, C1) et Muscat d'Italie (B, C2), 4 mois après l'inoculation par *P. chlamydospora* et *N. parvum. Pch :* plante inoculée par *P. chlamydospora, Np :*plante inoculée par *N. parvum,* C *:* plante saine n'ayant subi aucun traitement et CP: plante témoin inoculée par milieu liquide TSB et un disque stérile de MA.... 84

Figure 29. Mise en évidence de l'efficacité des trois traitements biologiques B6, S5 et B6+ S5 à réduire respectivement la taille des nécroses internes dues à *P. chlamydospora* (A) ou *N. parvum* (B) et externes dues à *N. parvum* (C) sur Cabernet Sauvignon et Muscat d'Italie. C : contrôle négatif n'ayant subi aucun traitement biologique, CP : Contrôle négatif percé. Les barres de données présentant la même lettre minuscule ou majuscule ne diffèrent pas significativement entre elles, P> 0.05 par le test de Kruskal-Wallis..... 86

Figure 30. Mise en évidence de l'effet variétal sur les communautés bactériennes colonisant le bois de vigne cv. Cabernet Sauvignon et Muscat d'Italie (A). ACP des communautés bactériennes (B) et fongiques (C) colonisant le bois de boutures cv. Cabernet sauvignon traitées par *N. parvum*. Les ellipses correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. 89

Figure 31. Analyses en composantes principales des communautés fongiques colonisant le bois de boutures cv. Cabernet sauvignon (A) et cv. Muscat d'Italie (B) traitées par *P.chlamydospora*. Les ellipses correspondent à l'intervalle de confiance à 95%.. 91

Résumé : Les maladies du bois de la vigne (MDBs) et plus particulièrement l'esca, sont devenues en l'espace de deux décennies l'objet de préoccupations majeures puisqu'elles mettent en danger la pérennité de nombreux vignobles partout dans le monde. En Tunisie, ces maladies sont peu connues mais elles semblent être en pleine expansion et, en France, environ 13% du vignoble est improductif à cause des dépérissements qu'elles provoquent. Pour lutter contre les MDBs, les filières viticoles françaises et tunisiennes sont actuellement dans une impasse technique car elles ne disposent d'aucune méthode de lutte chimique « curative ». Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est de (i) de déterminer quels agents pathogènes sont responsables des dégradations du bois de la vigne en Tunisie ? Les symptômes correspondent-ils à ceux de l'esca ? Existe-t-il une spécificité des agents pathogènes chez les ceps tunisiens ? Aussi (ii) afin de lutter contre ces maladies du bois (MDBs), de potentiels agents de biocontrôle bactériens ont été recherchés dans les parties ligneuses de ceps sélectionnés dans des vignobles tunisiens. Ils ont été caractérisées et des essais de protection *in planta* ont été réalisés.

Dans un premier temps, une prospection de 10 vignobles dans la région nord de la Tunisie a été effectuée pour déterminer l'existence des MDBs. Selon les sites de prélèvements, le pourcentage de ceps exprimant des symptômes semblables à ceux de l'esca variait de 0,3 à 6%. Trois champignons connus pour leur implication dans les MDBs, *i.e. Lasidiodiplodia pseudotheobromae*, *Neofusicoccum parvum* et *Schizophyllum commune*, ont été isolés du bois nécrosé de ceps de vignes présentant des symptômes foliaires d'esca prélevés dans la région de Mornag. Ces champignons ont été identifiés au niveau morphologique et moléculaire. Leur pathogénicité a été confirmée après inoculation sur jeunes plants de vigne. Des travaux originaux basés sur la co-inoculation de plants de vigne par ces 3 pathogènes ont montré qu'ils pouvaient rentrer en compétition entre eux au sein du végétal. Par ailleurs, sur le même thème, 2 autres pathogènes des MDBs, *i.e. Phomopsis viticola* et *Diploidia seriata*, ont été isolés dans une autre étude à partir de ceps prélevés dans la même région en Tunisie.

Dans une deuxième étape, la microflore bactérienne colonisant les tissus ligneux de vignes prélevées dans le nord de la Tunisie a été étudiée afin de rechercher des agents de lutte biologique potentiels. La technique d'empreinte moléculaire Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) a d'abord montré que les communautés bactériennes étaient différentes en fonction des tissus qu'elles colonisaient, *i.e.* le bois nécrosé ou sain. Soixante-neuf souches bactériennes ont été isolées par méthode pasteurienne, et les 19 souches les plus abondantes ont fait la suite de l'étude. L'identification moléculaire de ces souches par séquençage de l'ARNr 16S et du gène rpoB a montré l'existence de 4 genres colonisant les ceps de vignes : *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Pantoea* et *Pseudomonas*. Ces bactéries ont été également caractérisées au niveau biochimique, métabolique et génétique. Des tests de sélection *in vitro* contre les trois pathogènes fongiques ont été effectués, suite auxquels, une souche B6 de *B. subtilis* a été sélectionnée pour des essais de protection *in planta* en serre.

Par la suite, une étude combinant deux bactéries antagonistes isolées de bois de vigne tunisien, *i.e. B. subtilis B6*, et français, *i.e. Pantoea agglomerans* S5, a été réalisée pour lutter contre 2 agents pathogènes, *Phaeomoniella chlamydospora* (isolé des vignobles français) et *N. parvum* (isolé des vignobles tunisiens), impliqués dans les MDBs. Deux cépages, un fréquent en Tunisie, le Muscat d'Italie, et l'autre en France, le Cabernet Sauvignon, ont été utilisés. En effet, suivant l'agent pathogène et le cépage utilisés, les résultats de protection obtenus étaient différents. Les meilleurs résultats de protection ont été obtenus en combinant les bactéries et en les appliquant sur Muscat d'Italie contre les 2 champignons pathogènes. La spécificité et l'efficacité de la protection biologique a ici été démontrée.

Mots clés : Effet variétal, empreinte moléculaire (SSCP), esca, lutte biologique, microflore fongique et bactérienne, vigne.

Abstract : Grapevine trunk diseases (GTDs) such as esca are of major concern for viticulture worldwide. In Tunisia, knowledge about the symptoms of this disease and the microflora associated with, is still incomplete despite their ability to cause considerable damage to vineyards. In France, around 13% of whole vineyard is unproductive because of GTDs, and no effective treatment currently exists. In that context, the objectives of the present PhD study were : (i) to characterize the fungal microflora inhabiting the wood tissues of Tunisian esca-foliar symptomatic vines in order to identify the pathogens responsible for wood decay. (ii) To investigate the bacterial microflora colonizing the wood tissues of Tunisian grapevines cv. Muscat d'Italie in order to find a suitable Biological Control Agent (BCA) that can be applied to vineyards.

First, in order to better characterize the microflora colonizing the wood tissues of vine, samples were collected from 10 vineyards in the north of Tunisia. Fungal isolates were obtained from trunk of grapevines showing decline, small and distorted leaves and chloroses. To identify the isolated fungal species, sequencing of the Internal Transcribed Spacer region of the rDNA was performed (ITS1 and ITS4 primers). Three pathogens, *i.e. Lasidiodiplodia pseudotheobromae*, *Neofusicoccum parvum* and *Schizophyllum commune*, described in the literature as involved in GTDs were isolated for the first time in Tunisia. Their pathogenicity was confirmed *in planta*. Moreover, the co-inoculation of these 3 fungi *in planta*, showed that they displayed a competitive inhibition effect on each other. In another study, two others pathogens involved in GTDs, *i.e. Phomopsis viticola* and *Diploidia seriata* were also isolated from the same region.

This PhD also aimed at identifying the bacterial microflora inhabiting the wood tissues of esca-foliar symptomatic *vines*, *i.e.* necrotic and non-necrotic wood, using microbiological and molecular approaches. Complex bacterial communities, as shown by Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) analyses, colonize both types of wood tissues. After isolation, the 19 most abundant cultivable strains were sequenced (16S rRNA and rpoB genes) and identified as belonging to four genera: *Bacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas* and *Curtobacterium*. They were then screened for their *in vitro* antagonistic traits against the three pathogenic fungi *L. pseudotheobromae*, *N. parvum* and *S. commune*.

Based on the results obtained, two bacterial strains were selected: *B. subtilis* (strain B6) and *Pantoea agglomerans* (strain S5), respectively isolated from Tunisian and French grapevines. They were then tested *in planta* on young vines of cv Muscat d'Italie and Cabernet Sauvignon against two fungal pathogens involved in GTDs, *i.e. N. parvum* (isolated from Tunisian wood) and *Phaeomoniella chlamydospora* (isolated from French vines). Young vines of both cultivars were inoculated by *B. subtilis* B6, *P. agglomerans* S5 or the combination of B6+S5, singly or in combination with *N. parvum* and *P. chlamydospora.* In terms of plant protection, the most efficient condition to reduce *in planta* necrosis caused by the fungal pathogens in the two cultivars was the combination of the two bacteria. However, bacterial treatments were significantly more efficient to reduce necrosis caused by *N. parvum* or *P. chlamydospora* in Muscat d'Italie than in Cabernet Sauvignon.

Key words: Esca, fungal and bacterial microflora, grapevine, molecular fingerprinting (SSCP), variety effect.

Introduction générale

La viticulture avec ses productions diversifiées, *i.e.* vin, jus, eaux de vie, raisins sec et frais, occupe une place importante dans l'agriculture mondiale (OIV, 2014). Le raisin est ainsi, après les agrumes (124 millions), le deuxième fruit le plus cultivé au monde avec 68 millions de tonnes produites en 2010 (Samaali, 2012). Selon l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV), en 2014, la superficie agricole dédiée à la viticulture était de 7573 millions d'hectares, avec plus de la moitié sur le continent européen et 21000 hectares en Tunisie. Cette filière viti-vinicole est aussi économiquement très importante à l'échelle mondiale. Par exemple en France en 2015, la viticulture a été le 1er secteur agroalimentaire excédentaire et le 2ème secteur excédentaire après l'aéronautique, la valeur des exportations ayant été estimée à 11,7 milliards d'euros dont 10,4 milliards d'euros avec un solde commercial positif (source Fédération des Exportateurs de Vins et Spiritueux). En Tunisie, elle occupe une place importante dans l'économie aussi bien par les surfaces cultivées que par le volume des exportations. La Tunisie est parmi les principaux pays exportateurs de raisins frais et secs. Le vin en vrac et en bouteille est principalement exporté vers la France (57648 hL de vin en bouteille et 960000 hL de vin en vrac en 2015). Cette culture constitue donc un secteur économique important, source d'emplois et surtout de taxes (La revue du vin de France).

La vigne, comme tout autre organisme vivant animal ou humain, est exposée aux attaques par des bioagresseurs (facteurs biotiques) comme les bactéries, virus, nématodes, champignons, insectes… dont les dégâts peuvent être considérables si aucun moyen de lutte n'est employé. Elle peut aussi être endommagée par plusieurs facteurs environnementaux (facteurs abiotiques) comme la chaleur, le vent, l'humidité ou la sécheresse. L'intensification de la culture du raisin de table par l'utilisation de cépages vigoureux, la fertilisation abondante et l'emploi excessif de pesticides, ainsi que la conservation de grappes mûres sur pied au vignoble ont fait émerger différentes maladies cryptogamiques qui attaquent les vignobles français et tunisiens. Les principales sont : l'oïdium causé par le champignon ascomycète *Erysiphe necator*, le mildiou dû à l'oomycète *Plasmopara viticola*, et la pourriture grise dont l'agent fongique responsable est *Botrytis cinerea*. Différents moyens de lutte chimique, prophylactique et biologique sont actuellement utilisés pour prévenir et limiter l'installation de ces maladies.

Toutefois, une nouvelle crise majeure, l'épidémie des maladies du bois de la vigne (MDBs), *i.e.* esca, eutypiose et dépérissements à Botryosphaeriaceae, est devenue depuis le début des années 2000 l'objet de préoccupations majeures pour la filière viti-vinicole (Mugnai et *al*., 1999 ; Bertsch et *al*., 2013). Ces maladies sont en continuelle progression dans les principaux vignobles mondiaux et aucun produit phytosanitaire chimique efficace n'est homologué depuis le retrait de l'Arsénite de Sodium en 2001 en Europe. En France, 13% du vignoble est improductif principalement à cause de l'esca (Grosman et Doublet, 2012). En Tunisie, ces maladies sont peu connues mais elles semblent

être en pleine expansion et, là aussi, aucun moyen de lutte efficace n'existe actuellement. Il est donc nécessaire d'aider les viticulteurs à sortir de cette impasse. Pour cela, l'identification des agents pathogènes responsables du dépérissement du bois de la vigne et la recherche de moyens de lutte afin de réduire, voire de supprimer, l'incidence de cette maladie en Tunisie et en France doit être entreprise.

Dans ce contexte, la présente thèse s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche PHC Utique-CMCU intitulé : «Étude de la microflore colonisant les baies et le bois des ceps de vigne : intérêt pour le développement d'agents de contrôle biologique contre l'esca» élaboré entre le Laboratoire Microorganismes et Biomolécules Actives de la Faculté des Sciences de l'Université El Manar de Tunis (Tunisie) et l'UMR Santé et Agroécologie du Vignoble de l'INRA/Bordeaux Sciences Agro (France). Les objectifs sont (i) d'isoler et d'identifier les principaux champignons pathogènes responsables des maladies du bois de la vigne, notamment l'esca, dans des vignobles du Nord de la Tunisie. (ii) Isoler et purifier plusieurs bactéries endophytes colonisateurs du bois et (iii) évaluer leur activité antagoniste pour lutter contre l'esca. Ces travaux seront réalisés en utilisant deux cépages sensibles à l'esca et qui sont, pour le Cabernet sauvignon, très fréquent en France, ou en Tunisie pour le Muscat d'Italie.

Synthèse bibliographique

1. Histoire de la vigne

Le développement d'ancêtres de la vigne daterait de l'ère tertiaire (-65 millions d'année à -2.5 millions d'années) où le climat chaud de cette époque favorisait le développement de plantes grimpantes précurseurs du genre Cissus (Simon et *al*., 1977). Par la suite, la vigne a eu une place importante dans l'Histoire humaine. Elle est, par exemple, mentionnée dans (i) l'Égypte Antique où des présentations artistiques de cette plante illustrent les chambres funéraires de Saqqarah, alors que sa culture et la préparation du vin sont représentées sur les édifices de Louqsor (Fig. 1A) (Simon et *al*., 1977). (ii) En Tunisie, des mosaïques sur les activités vitivinicoles datant de l'époque carthaginoise (Zoghlami et *al*., 2001) sont exposées dans les principaux musées du pays, dont la magnifique mosaïque du musée de Sousse et Uthyne (Fig. 1B, C). (iii) La culture de la vigne et l'utilisation de ses produits sont fréquemment décrits dans les principaux livres religieux comme la Bible (Simon et *al*., 1977).

1.1 Histoire de la vigne en Tunisie

Les débuts de la viticulture en Tunisie datent de plusieurs millénaires. La première plantation de vigne remonte à la période punique (8 siècles avant J.C.) et les premières exportations des vins tunisiens avaient débuté 5 siècles avant J.C. dans tous les territoires du pourtour méditerranéen. Les premiers écrits scientifiques datent de l'époque carthaginoise et l'agronome Magon qui est considéré comme le père de la viticulture avait été le premier à adopter une approche rigoureuse sur la conduite du vignoble et les pratiques vitivinicoles, dont certaines sont encore actuellement appliquées.

Les vignobles tunisiens carthaginois étaient plantés dans les environs de Carthage (proche de Tunis), du Jardin d'Amilcar, au Cap Bon et en Byzacène. La viticulture tunisienne persistera après la conquête de Carthage par les romains, mais après la prise de pouvoir par les musulmans au 7ème siècle, la production de vin disparaitra presque complétement. Plus tard, au 19ème siècle, suite à l'immigration des italiens consécutive à la signature du traité du 8 septembre 1868 entre le bey de Tunis et le gouvernement italien, l'activité viticole se développera considérablement dans la région du Cap Bon (Dahmani, 2010).

Suite à l'instauration du protectorat français à Tunis en 1881, la production du vin a réellement été relancée. La crise majeure du phylloxéra qui a atteint le vignoble français à partir de 1863 avait alors favorisé l'exportation en quantités très importantes des vins tunisiens vers la France. Le vignoble tunisien a cependant lui aussi été attaqué par le phylloxéra, entre 1936 et 1947, et les

viticulteurs se sont alors rassemblés en coopératives afin de tenter de redresser la situation. Les contours des premières Appellations d'Origine Contrôlées (AOC) ont alors été mis en place.

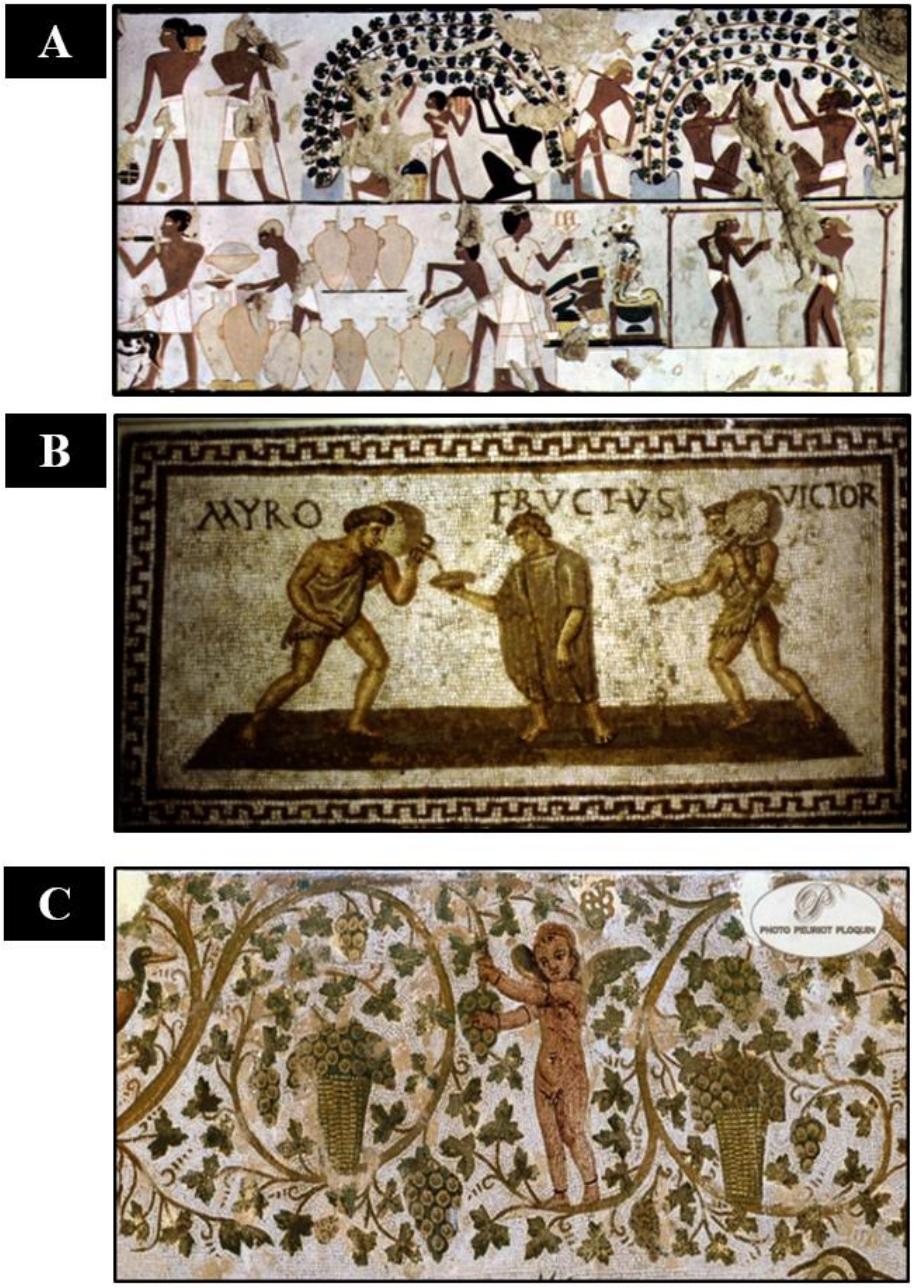

Figure 1. Vendage et vinification en Egypte (A) ; Mosaïques présentant la filière vitivinicole en Tunisie au musée de Sousse (B) et Uthyne (C).

2. Présentation de l'espèce végétale

2.1 Description et classification botanique de *Vitis vinifera*

La vigne est une plante grimpante pérenne qui appartient au genre *Vitis*. Elle fait partie des angiospermes dicotylédones selon la classification nommée « Angiosperm Phylogeny Group classification » (APG III) de Chase et Reveal (2009). La vigne appartient donc à la classe des Dicotylédones (deux feuilles embryonnaires à la base de la plantule), sous-classe de Archichlamydées (fleurs à pétales séparés) et à l'ordre des Rhamnales (Simon et *al*., 1977). La famille des Vitaceae comprend 14 genres différents (Ren et *al*., 2011), mais seul le genre *Vitis* est utilisé pour la production de raisin dans le monde. En Europe, les vignes ne comprennent qu'une seule espèce, *i.e. Vitis vinifera*. Celle-ci comprend un archétype de la vigne sauvage, *Vitis vinifera sylvestris* et un autre, *Vitis vinifera sativa* (Fig. 2) qui est la vigne cultivée (Reynier, 2003). Cette plante est une liane dont il faut discipliner l'allongement par la taille et qu'il faut palisser afin de l'élever au-dessus du sol (Berger, 1989). Elle est caractérisée par des tiges herbacées ou sarments. C'est un arbrisseau grimpant qui peut aller jusqu'à 5 m de haut avec une croissance rapide de 50 à 60 cm par an (Fig. 3). Le genre se divise en deux sous-genres : *Muscadinia* qui possèdent 40 chromosomes et *Euvitis* avec 38 chromosomes (Levadoux, 1956 ; Simon et *al*., 1977). Les hybrides issus de croisements entre ces deux groupes sont rarement fertiles du fait de la différence du nombre de chromosomes. Ces sous-groupes ont été constitués en fonction de l'anatomie et de la morphologie des plants (Planchon, 1887).

Le sous-genre *Muscadinia* ne comprend que trois espèces diploïdes (Keller, 2010) dont la plus connue est *Muscadinia rotundifolia.* Quant au sous-genre *Euvitis*, il se compose d'une soixantaine d'espèces diploïdes différentes se rassemblant en 3 groupes génétiquement et géographiquement distincts (Fig. 2) :

- Les vignes asiatiques comprennent une dizaine d'espèces peu résistantes aux différentes maladies. L'espèce la plus connue est *Vitis amurensis* qui est très résistante au mildiou et au froid mais qui est sensible au Phylloxéra (Levadoux, 1956, Simon et *al*., 1977).

- Les vignes américaines comprennent une vingtaine d'espèces. Elles ont généralement une bonne résistance aux principales maladies de la vigne (mildiou, oïdium, Phylloxéra), mais n'ont que peu d'intérêt d'un point de vue œnologique. Elles sont de ce fait très fréquemment utilisées comme porte-greffe ou elles sont croisées avec *V. vinifera* pour produire des hybrides. Parmi ces espèces on peut citer *V. labrusca, V. riparia, V. rupestris* et *V. berlandieri* (Simon et *al*., 1977).

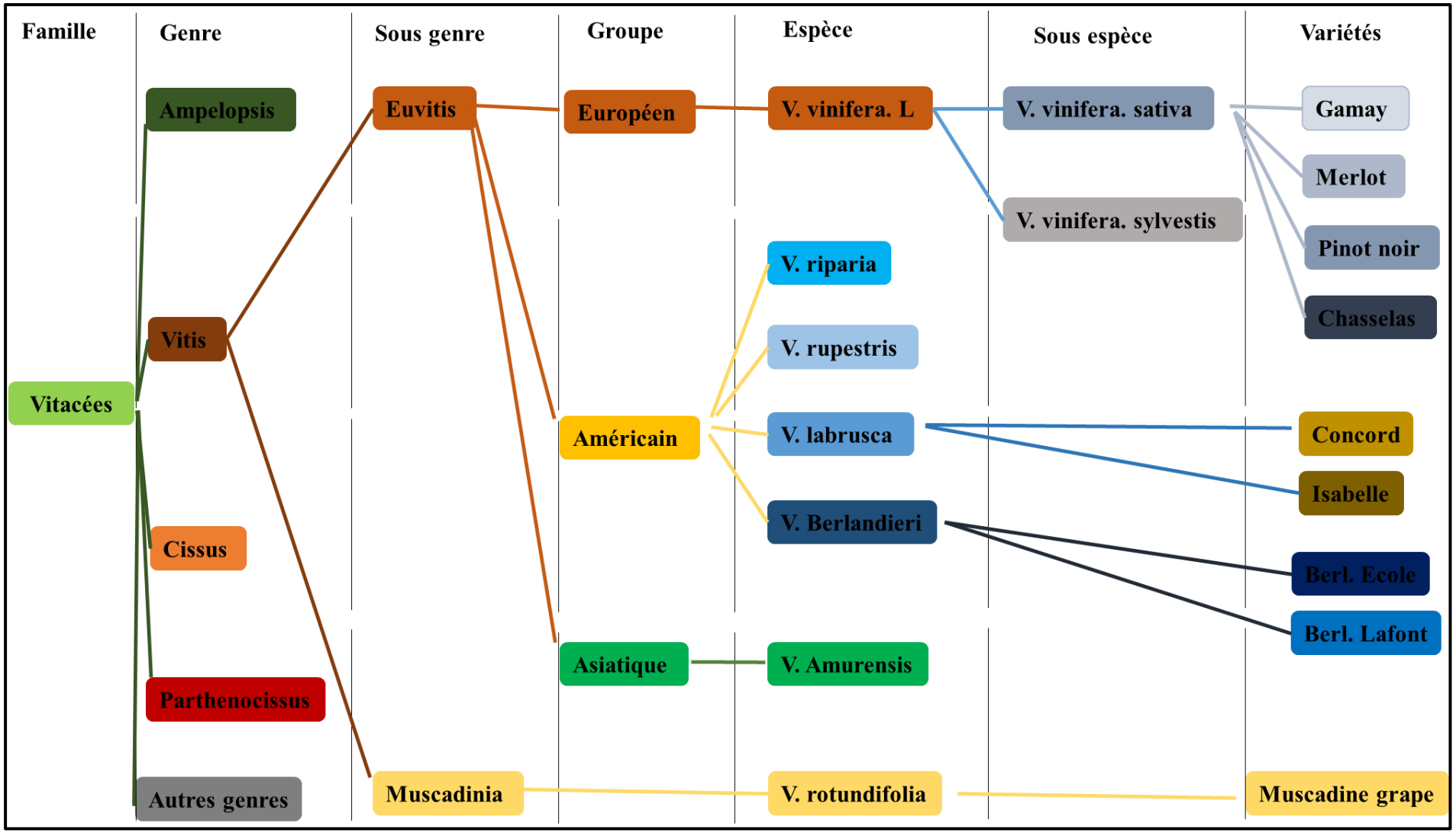

Figure 2. Classification botanique de la vigne selon Simon et *al*. (1977).

- Les vignes européennes ne comportent qu'une seule espèce *Vitis vinifera* Linné mais qui regroupe des milliers de variétés, encore appelées cépages. Cette espèce constitue la quasi-totalité des vignobles dans le bassin méditerranéen, notamment en Tunisie.

Le fort potentiel vinicole de *Vitis vinifera*, la sélection de cépages spécifiques et l'adaptation des pratiques culturales ont permis l'expansion de cette espèce sur tous les continents. Plus de 10 000 variétés de *Vitis* seraient aujourd'hui cultivées dans le monde.

Figure 3. La vigne est un arbrisseau grimpant (Rezgui, 2013)

2.2. Le cycle de développement de la vigne

2.2.1 Le cycle végétatif

Le cycle végétatif assure la pérennité du cep de vigne grâce au développement de l'appareil végétatif. En hiver, la vigne perd ses feuilles et entre en dormance, durant la période du novembre à février, la sève ne circule pas dans la plante. L'élévation des températures au début du printemps entraîne la reprise de l'activité végétative qui se traduit par l'écoulement de la sève brute par les plaies résultant de la taille, les viticulteurs parlent alors de la période des « pleurs » de la vigne (Fig. 4A). Le débourrement se traduit par la sortie des feuilles et la croissance rapide des pousses se met alors en place (Fig. 4B, C, D) (Samaali, 2012).

La pleine floraison a lieu généralement deux mois après le débourrement et l'aoûtement, comme son nom l'indique, débute au mois d'août et se poursuit jusqu'en novembre. Il s'accompagne d'une accumulation de réserves en amidon et en lignine dans les sarments, ce qui favorise la résistance des tissus au froid et permettra le début d'un nouveau cycle de développement au printemps suivant (Galet, 2000).

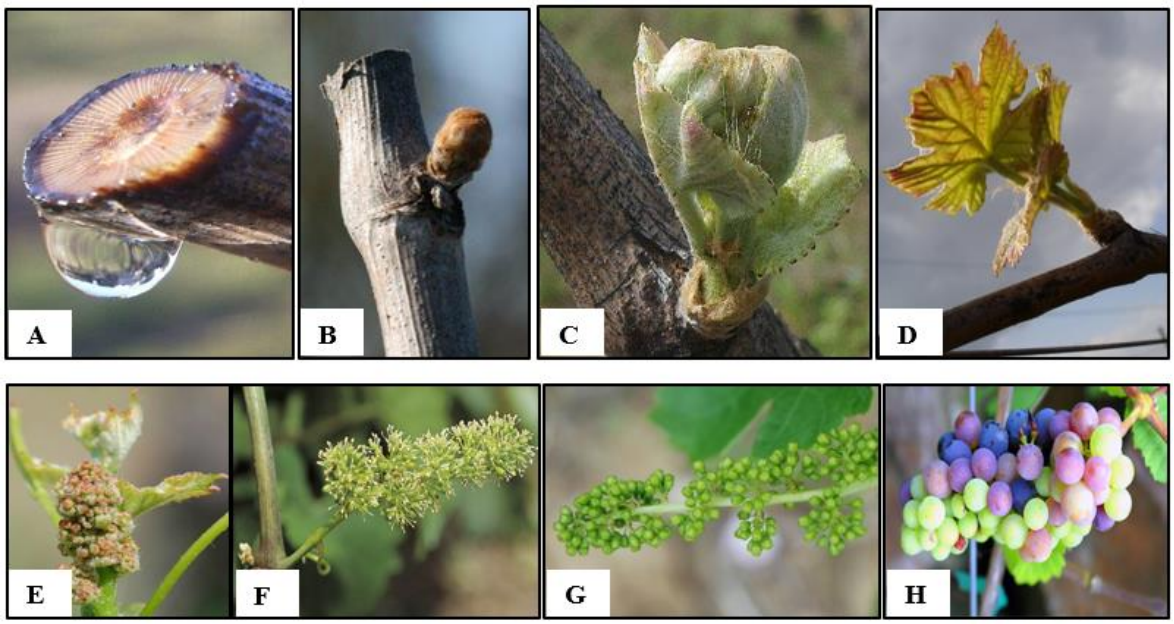

Figure 4. Stades phénologiques repères de la vigne. Débourrement « la vigne pleure » (A), Débourrement « gonflement de bourgeon » (B), Débourrement « ponte verte » (C), Développement des feuilles (D), Floraison (E, F), Développement des fruits (G) et Maturation des baies (H).

2.2.2 Le cycle reproducteur

Le cycle reproducteur se traduit par la formation des fleurs puis des fruits de la vigne. L'époque de la différenciation des bourgeons floraux varie en fonction des variétés et des conditions climatiques. Elle a lieu généralement entre avril et juin lorsque le bourgeon reprend son activité. La vigne se reproduit naturellement par fécondation croisée. À l'ouverture de la fleur, le pollen, très léger, est transporté par le vent vers les autres fleurs.

Le début du développement de l'ovaire, encore appelé « nouaison », est suivi de la croissance des baies et est corrélé avec l'accumulation d'eau et d'acides organiques (*i.e.* acides tartriques et maliques) dans la vacuole des cellules. La véraison se déroule au mois d'août et se caractérise par le changement de couleur des baies de raisins qui est dû à l'accumulation de pigments. La maturité des baies (Fig. 4H) résulte exclusivement du grandissement cellulaire. La récolte des raisins, ou vendange, se déroule généralement en septembre et/ou octobre et elle est effectuée manuellement

ou mécaniquement. La chute des feuilles à l'automne marque le début de la période de repos végétatif de la vigne. En fonction des soins qui lui sont prodigués et des conditions climatiques, la vigne peut vivre plusieurs dizaines d'années (Samaali, 2012).

2.3 Les exigences climatiques de la vigne

2.3.1 La lumière

La lumière constitue un facteur primordial dans le cycle végétatif et reproducteur de la vigne. Cette plante est héliophile, elle nécessite un climat lumineux (Galet, 1993) avec un ensoleillement entre 1500 et 1600 heures/an dont au moins 1200 heures durant la période de végétation (Simon et *al*., 1992). Les grandes insolations donnent des raisins sucrés, peu acides, tandis qu'à l'ombre ou par temps brumeux, les fleurs nouent mal et les bourgeons ombrés durant la période d'initiation florale présentent une forte diminution de la fertilité (Reynier, 1991).

2.3.2 La température

La vigne est exigeante en chaleur, c'est une plante qui pousse dans la partie chaude des zones tempérées. La chaleur est primordiale pour la floraison, la fécondation et la maturation. Afin que les grappes parviennent à maturité, elles ont besoin de seuils thermiques précis en été. Ainsi, les températures supérieures ou égales à 10°C sont considérées comme étant le zéro de végétation (Galet, 2000 ; Briche, 2011). Lorsqu'elles sont inférieures à 10°C, un développement très lent est observé chez les cépages précoces, une température entre 10 et 30°C stimule le développement et une température supérieure à 40°C provoque un desséchement et des brûlures plus ou moins graves suivants les années (Huglin, 1986).

Il faut également préciser que les zones traditionnelles où la vigne est plantée sont caractérisées par l'absence de fortes gelées. La vigne est en effet sensible aux gelées de printemps.

2.3.3 L'eau

La vigne est résistante à la sécheresse, elle ne supporte pas l'excès d'humidité à l'exception des cépages tardifs. La vigne nécessite des précipitations de 600 mm/an environ (Simon et *al*., 1992) depuis le débourrement jusqu'à la vendange. La pluviométrie supérieure à 500 mm donne de bons rendements. Ainsi, les pluies du printemps sont très importantes car elles conditionnent la vitesse de croissance, l'élongation finale des rameaux et l'importance de la surface foliaire. Néanmoins dans certains pays, la vigne croît alors que les précipitations ne dépassent pas 300 mm/an grâce à des travaux du sol qui limitent l'évaporation de l'eau (Simon et *al*., 1977). Il faut noter que l'excès

de précipitation (>1000mm/an) accroit les maladies cryptogamiques comme le mildiou et la pourriture grise (Simon et *al*., 1977).

2.3.4 Le vent

Le vent intervient en modifiant les autres facteurs météorologiques, son effet peut être favorable ou non pour le développement de la vigne. Un faible vent de printemps peut empêcher la formation de gelées nocturnes, et un vent violent pendant l'été dessèche l'air et le sol et provoque le folletage, ce qui induit un stress chez les jeunes souches et induit des blessures.

2.4 Intérêt économique de la vigne

La culture de la vigne s'est répandue sur tous les continents. Elle occupe une place majeure dans le secteur agricole de plusieurs pays viticoles, *i.e.* France, Italie, Espagne, Turquie, etc, et une place importante dans leur économie par le biais de la production de vin ainsi que de raisin sec ou de table (Reynier, 1991). Selon les secteurs, *e.g.* alimentaires, pharmaceutiques, etc…, toutes les parties de la vigne peuvent être utilisées, *i.e.* les fruits, les feuilles, la sève, le bois et les sarments (Iserin, 2001 ; Judd et *al*., 2002).

En effet, les produits alimentaires issus de la vigne, sont vendus dans les grandes surfaces commerciales partout dans le monde : jus de raisins, huile de pépins de raisin, gelées, confitures, raisins secs, raisins frais tels que le dattier, le muscat et le raisin noir (Bartels, 1998 ; Judd et *al*., 2002).

Les extraits de vigne et de raisin sont également connus pour être exploitables dans le domaine de la cosmétique en France. Plusieurs produits cosmétiques sont ainsi obtenus à partir des ceps plantés dans les vignobles du Bordelais, de la Champagne et de la Bourgogne. Les polyphénols contenus dans les pépins de raisin produisent des antioxydants pour le visage ; le resvératrol contenu dans les sarments sert à la fabrication des sérums anti-âge et anti-rides ; la sève entre dans la composition des crèmes anti-tâches ainsi que des parfums.

La vigne est connue aussi pour son usage médical. Une infusion de feuilles de vigne est utilisée pour soigner les diarrhées, les règles et hémorragies utérines, ainsi que les aphtes. Les feuilles participent aux soulagements des troubles de la ménopause, diminuent la perméabilité capillaire, améliorent l'aspect de la peau du visage (Iserin, 2001). Les fruits favorisent le retour veineux, allègent les jambes et améliorent les troubles circulatoires grâce aux tanins. Ils sont aussi utilisés pour traiter les varices, les hémorroïdes et la fragilité capillaire (Boullard, 2001).

3. Importance de la viticulture

3.1 Dans le monde et en France

3.1.1 Évolution de la superficie viticole mondiale

Selon les statistiques de l'Organisation Internationale du la Vigne et du Vin (OIV) en Avril 2016, la superficie viticole mondiale a connu une légère diminution entre les années 2000 (7847 Mha) et 2014 (7541 Mha) (Fig. 5A). Le vignoble du continent Européen a le premier rang en terme de superficie mais une tendance à la baisse a été observée entre 2000 où il constituait 63% de superficie mondiale et 2014 où il représentait 54%. L'Asie représentait 25.4% de la superficie mondiale en 2014, l'Amérique 13.8% et l'Afrique et l'Océanie respectivement, 4.8% et 2.5%.

Au niveau de l'Europe, en 2014, l'Espagne avait la plus grande superficie viticole (25.14%) suivie par la France (19.5%) et l'Italie en troisième position (17%). Concernant les autres continents : pour l'Asie, 41.54% de la superficie était localisée en Chine ; pour l'Amérique, 40.63% était aux États Unies ; en Afrique, 36% était en Afrique de Sud et pour l'Océanie, 80% était en Australie (Tableau 1).

Tableau 1. Superficie des principaux pays viticoles en 2014 dans le monde (source OIV).

Pays	Superficie totale (%)	Superficie par pays (%)
Europe	53.70%	25.14% Espagne, 19.50% France, 17.00% Italie
Asie	25.40%	41.54% Chine, 26.10% Turquie
Amérique	13.80%	40.63% États Unis, 21.70% Argentine, 20.17% Chili
Afrique	4.80%	36.00% Afrique de Sud
Océanie	2.50%	80.00% Australie

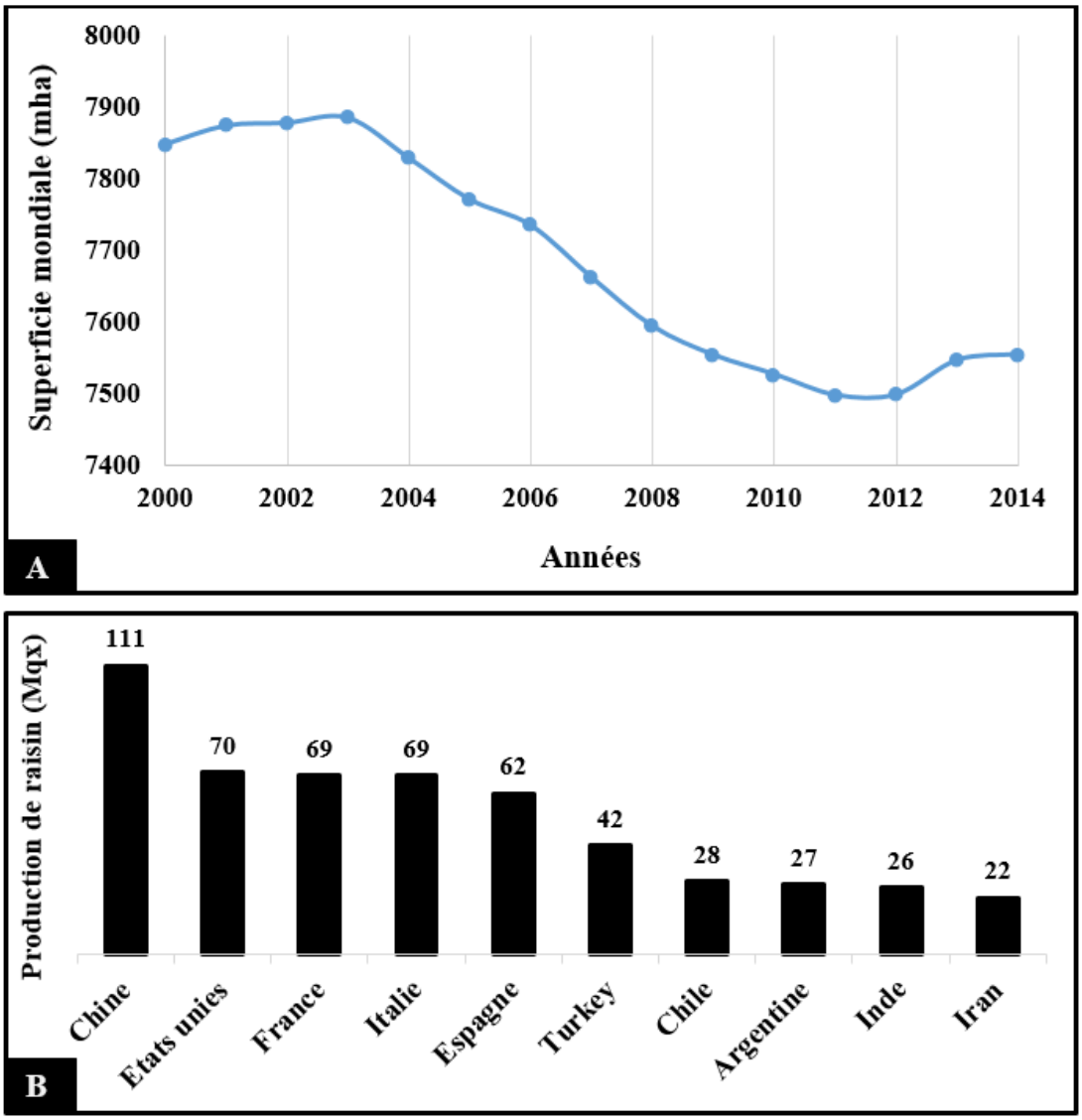

Figure 5. Évolution de la superficie viticole mondiale (A ; OIV, 2015). Les dix premiers producteurs mondiaux de raisin (B).

3.1.2 Production vitivinicole mondiale

A l'échelle mondiale, le fruit de la vigne est utilisable sous plusieurs formes : raisins frais ou sec, jus de fruits et produits de transformation du raisin, *i.e.* le vin et les eaux de vie. Selon l'OIV, en 2014, la Chine occupait la première place en terme de production de raisin (111 Mqx), suivie des États Unis (70 Mqx), de la France et de l'Italie avec une production équitable de (69 Mqx) (Fig. 5B). Le vin est le principal produit de production vitivinicole en Europe (France, Espagne, Italie), Amérique (États Unis, Argentine, Chile), Afrique (Afrique de Sud) et en Australie. Tandis que pour l'Asie, c'est le raisin frais qui constitue la majorité de la production vitivinicole (Chine, Inde, Iran et Turquie) (Fig. 6A, OIV, 2015).

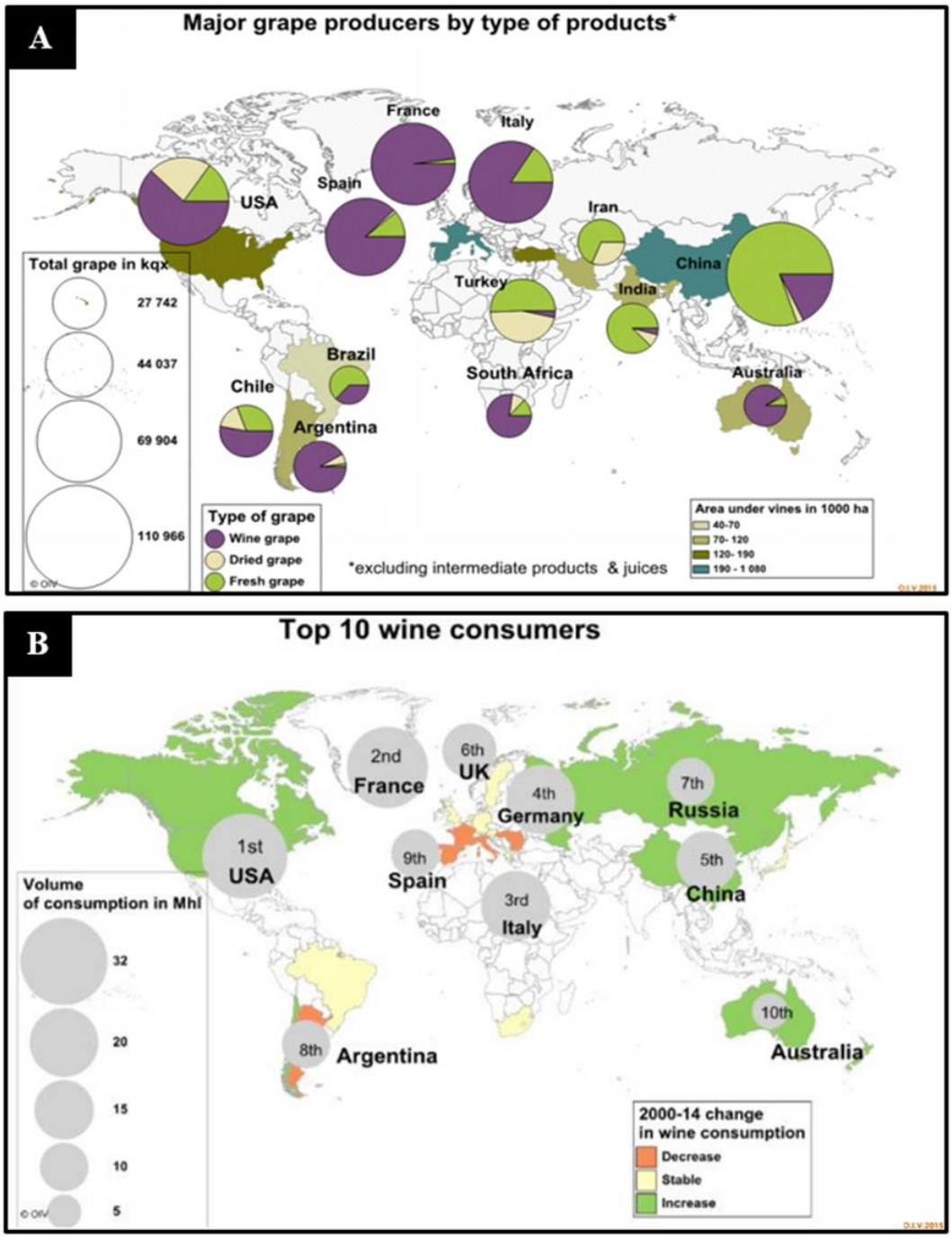

Figure 6. Principaux pays producteurs de raisin, par type de produits (A). Les 10 premiers pays consommateurs de vin à l'échelle mondiale (B; OIV, 2015).

Dix pays seulement produisaient 80% du marché mondial de vin en 2014 (source OIV). La France, l'Italie et l'Espagne occupaient les trois premières places avec des quantités respectivement de 46698 Mha, 44739 Mha et 41620 Mha, suivie de l'Allemagne (3% de production mondiale). L'Amérique produisait 18% du vin mondial alors que la production en Asie, Océanie et Afrique (4%) était relativement semblable (Tableau 2).

La France, l'Italie et l'Espagne représentent plus de la moitié des exportations mondiales en valeur monétaire (15.2 Mrd EUR). Le chiffre d'affaires de la France représente 30% du marché international. Le Portugal, l'Afrique du Sud, le Chili et l'Argentine connaissent une baisse de leur volume d'exportation mais pas de leurs valeurs ; par exemple, le Portugal connait une hausse de sa valeur de 1.4%. La Nouvelle Zélande a une hausse de 9.4% de ces exportations en valeur, ce chiffre s'accroit plus vite que celui de son volume (OIV, 2016).

Au niveau de la consommation en vin, la France occupe la seconde place après les États Unis (Fig. 6B; OIV, 2015).

Tableau 2. Production de vin à l'échelle mondiale en Mhl (OIV, 2015).

Pays	Production du vin (Mhl, 2014)	RANG
France	**46698**	**1**
Italie	**44739**	**2**
Espagne	**41620**	**3**
Êtas Unies	22300	4
Argentine	15197	5
Australie	12000	6
Afrique du sud	11316	7
Chine	11178	8
Chili	10500	9
Allemagne	9334	10
Portugal	6195	11
Romanie	4093	12
Nouvelle-Zélande	3204	13
Grèce	2900	14
Hongrie	2734	15
Brésil	2732	16
Autriche	2250	17
Bulgarie	1228	18

3.2 Superficie et production viticole tunisienne

3.2.1 Le vin

Actuellement, la superficie dédiée à la culture de la vigne en Tunisie est de 21000 ha (OIV, 2014). Elle comprend sept A.O.C : Grand Cru Mornag, Mornag, Coteau de Tébourba, Sidi Salem, Kélibia, Thibar et Côteaux d'Utique (Fig. 7A).

La culture de la vigne occupe la septième position derrière l'amandier, le pistachier, le dattier, le figuier, les agrumes, et le pommier (DG/EDA communication personnelle, 2012), avec une production annuelle de 1680000 tonnes en 2012 (OIV). Le mode de conduite libre en gobelet (Fig. 7B) est prédominant par rapport au système de palissage.

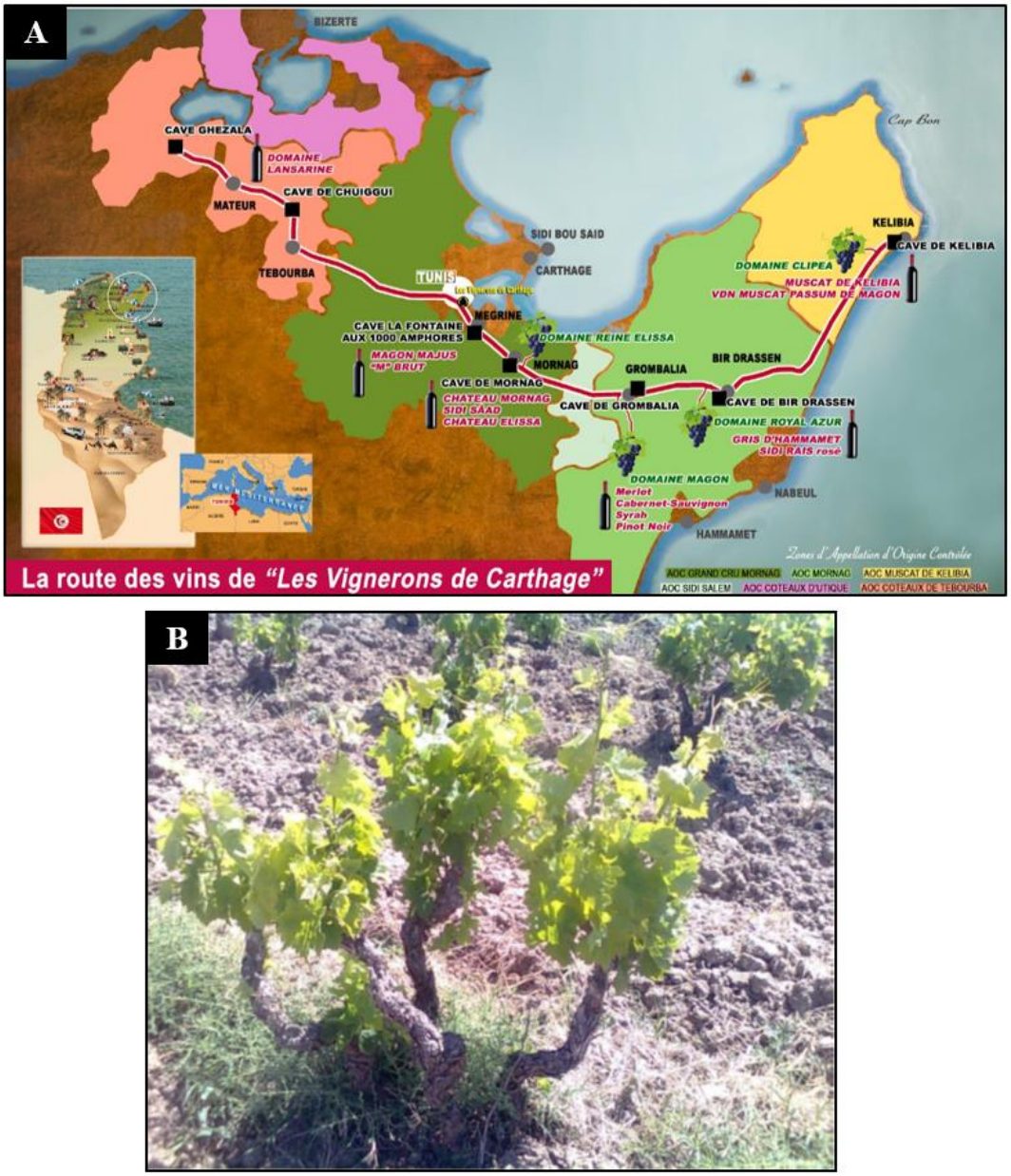

Figure 7. Carte présentant les 7 AOC de Tunisie (A ; Poulain d'Andecy, 2012) Taille en gobelet (B, Rezgui, 2013).

Pour toutes les appellations et pour environ 80% des parcelles de vigne, la densité de plantation est de 2222 pieds/ha. Cela correspond à un écartement de 3 mètres entre les rangs et de 1.5 m entre les ceps au sein de chaque rang (D'khili et Mouley, 2007). En Tunisie, le vin rosé occupe la première place suivi du vin rouge et du blanc (Fig. 8A). La région de Nabeul est celle où la production de vin est la plus élevée (Fig. 8B).

Sur le plan économique, les vins tunisiens sont commercialisés en (i) Europe, la France a importé 57648 hL de vin en bouteille et 960000 hL de vin en vrac en 2015, l'Allemagne a importé 312000 hL de vin en vrac. (ii) En Asie, le Japon a importé 4602 hL de vin en bouteille durant la même période (Fig. 8C).

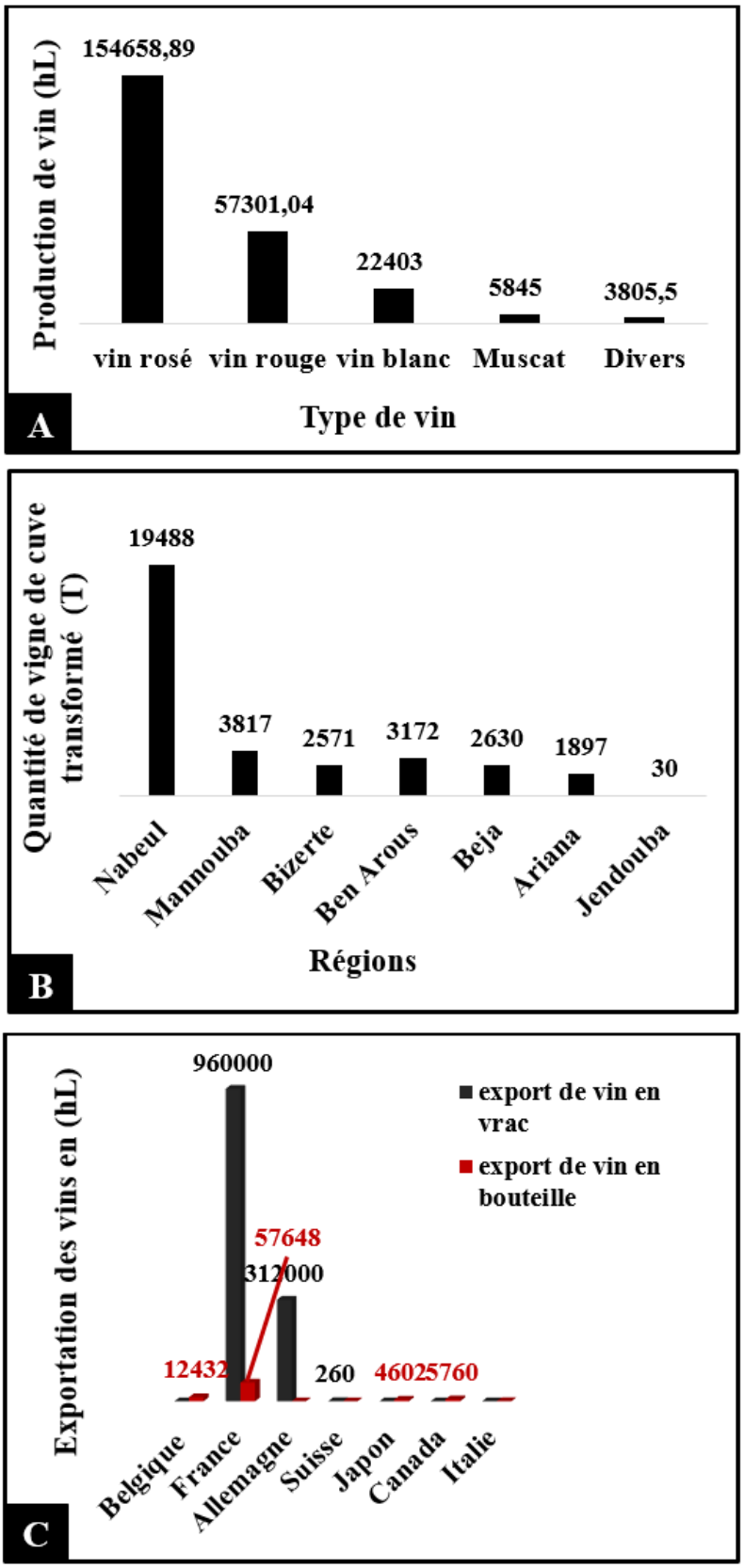

Figure 8. Production de vins tunisiens (A), quantités de vigne de cuve transformées par région (B) et exportation de vins tunisiens (hL) pour l'année 2015 (C ; http://gifruits.com).

3.2.2 Le raisin de table

Concernant la superficie et la production de raisin de table, le gouvernorat de Ben Arous occupe la première place avec 2420 ha, suivi par celui de Bizerte 2130 ha et Nabeul 1100 ha (DG, EDA, 2012).

Le gouvernorat de Ben Arous est le premier producteur de raisin de table en Tunisie avec une production totale de 56000 t (Communication personnelle, 2011) soit plus de 49% de la production nationale. La production totale nationale de raisin de table pour l'année 2012 avait été de 123000 tonne (OIV).

En Tunisie, les variétés cultivées sont soit locales, soit elles ont été introduites. Un grand nombre de variétés autochtones sont utilisées pour leurs caractéristiques organoleptiques, elles sont cultivées de la région de la montagne de Kroumirie-Mogods (Nord de la Tunisie) à celle de Rjim-maâtoug (Sud de la Tunisie) (Zoghlami et *al*., 2001). Certaines variétés sont plantées partout en Tunisie, *i.e.* Turky, Bidh Hamem, Hamri, Arich, Razzagui, Sakasly, alors que d'autres sont localisées uniquement au Nord, *i.e.* El Biodh, ou au sud du pays, *i.e.* Khamri, Chaouch, Meski (Tableau 3).

A partir des années 1970, afin d'améliorer les rendements, d'autres variétés ont été introduites. A titre d'exemple, la variété Superior Seedless a été introduite dans la région Djerba, celles appelées Cardinal, Muscat d'Italie et Superior d'Italie ont été plantées dans la région de Médenine et celle nommée Muscat d'Alexandrie dans la région de Zarzis (Ghafari et Ferchichi, 2011).

4. Les maladies de la vigne

La vigne, comme la plupart des plantes, est sensible aux attaques par des bioagresseurs variés : bactéries, phytoplasmes virus, insectes, levures et champignons. Dans ce document de thèse, seules les maladies fongiques seront décrites. Lorsque la partie herbacée aérienne est atteinte, les principales maladies sont : le mildiou (*Plasmopara viticola*), la pourriture grise (*Botrytis cinerea*) et l'oïdium (*Erysiphe necator*). Lorsque la partie ligneuse des ceps est atteinte, on utilise l'appellation de maladies du bois de la vigne (MDBs-dues à un complexe de champignons) ; les principales étant l'eutypiose, les dépérissements à Botryosphaeriaceae et l'esca.

Tableau 3. Liste des variétés de vigne autochtones cultivées en Tunisie (Zoghlami et *al*., 2001, 2009, Ghafari et Ferchichi, 2011)

Origine	Variétés
Baddar (Nord de la Tunisie)	Beldi Baddar Dattier de Beyrout Baddar Arich Dressé Turky Bidh Hamem Razegui Sakasly El Biodh
Balta (Nord de la Tunisie)	Balta 1, 2, 3, 4
Djebba (Nord de la Tunisie)	Blanc 1, 2, 3 Djebbi Khediri 1, 2, 3 Bahbahi
Mornag (Nord de la Tunisie)	Amokrane Arbia Beldi Sayeb Arich Ahmar Arich Dressé
Rafraf (Nord de la Tunisie)	Châaraoui Muscat Rafraf Marsaoui Farrani Beldi Rafraf Bezzoul El Khadem Razaki Rafraf Beldi local Rafraf Bidh Hamem Rafraf Akhal Mguergueb
Tozeur (Sud de la Tunisie)	Khamri Meski local Tozeur Khalt Abiedh
Djerba (Sud de la Tunisie)	Chaouch Sakasly Jerba Tounsi Arich Jerba Mguergueb
Nafta (Sud de la Tunisie)	Saouadi Sfaxi Khalt Guelb Sardouk
Déguache (Sud de la Tunisie)	Jerbi
Hencha (Sud de la Tunisie)	Hencha 1, 2
Kerkennah (Sud de la Tunisie)	Hamri Kerkennah Kahli Kerkennah Mahdaoui Asli Dar Slimane Asli Hadab
Sfax (Sud de la Tunisie)	Bidh Hamem Sfax Kahli Sfax Bezzoul Kelba el Bidha de Sfax
Zarzis (Sud de la Tunisie)	Razzagui Meski Aricha Nab Jmel
Médenine (Sud de la Tunisie)	Beldi Razzagui Siper Abiadh Meski Tounsi Mguargueb Arbi Dalia Akhal Akhal Twil Turki
Gabès (Sud de la Tunisie)	Médina Bezzoul Kelba el Bidha Khalt Bouchemma Khalt Mdaouer Meski Korkobbi Mlouhi Mkarkeb Saoudi

4.1 Les maladies cryptogamiques aériennes de la vigne

4.1.1 Le mildiou – *Plasmopara viticola*

Originaire du continent Americain, spécialement du Nord des États-Unis, le mildiou de la vigne s'est répandu dès 1880 dans toute l'Europe, puis dans le monde entier (Dubos, 2002). Cette maladie cryptogamique est provoquée par un parasite obligatoire biotrophe qui nécessite un hôte vivant pour se développer, croître et survivre ; et qui attaque tous les tissus herbacés de la vigne, *i.e.* rameaux, feuilles, grappes, vrilles (Viret et Gindro, 2014).

Cet oomycète pathogène, *i.e. Plasmospara viticola* a été la cause avec l'oïdium et le phylloxéra, d'importantes diminutions des surfaces viticoles à la fin de 19ème siècle (Viret et Gindro, 2014). Dans les régions à climat tempéré et humide, cette redoutable maladie est responsable de dégâts économiques importants sur le plan quantitatif et qualitatif (Viret et Gindro, 2014). Le volume de la récolte peut être considérablement réduit suite à l'attaque des ceps par le mildiou (Dubos, 2002). Cette maladie peut donc détruire la récolte de la saison lorsque les conditions climatiques sont favorables au développement de *P. viticola, i.e.* températures dépassant 12°C et des précipitations d'au moins 10 mm en 24 h ; et en absence de moyens de lutte efficace (Simon et *al*., 1977).

Les premiers symptômes de la maladie s'observent au niveau des feuilles, elles constituent la source majeure d'inoculum pour l'infection d'autres parties aériennes. Sur la face supérieure des feuilles, les symptômes se manifestent par l'apparition de tâches circulaires d'apparence huileuse (tâches d'huile) et de couleur jaunâtre (Fig. 9A). Sur la face inférieure, des pulvérulences blanchâtres sont dues aux fructifications du champignon ; elles servent à la dissémination de la maladie (Fig. 9B). Le mildiou entraine la chute des feuilles et un retard de maturité, une plus grande sensibilité au gel, un retard de débourrement, et une incidence défavorable sur la production, le vin peut avoir un degré alcoolique plus faible. Au stade de floraison, les symptômes apparaissent sur les grappes avec, dans un premier temps, un brunissement et une déformation des rafles puis, un recouvrement des futures baies par un duvet blanc (Fig. 9D). Les sarments de vigne peuvent également être infectés par l'oomycète, lorsque celui-ci a déjà envahi les feuilles et les baies.

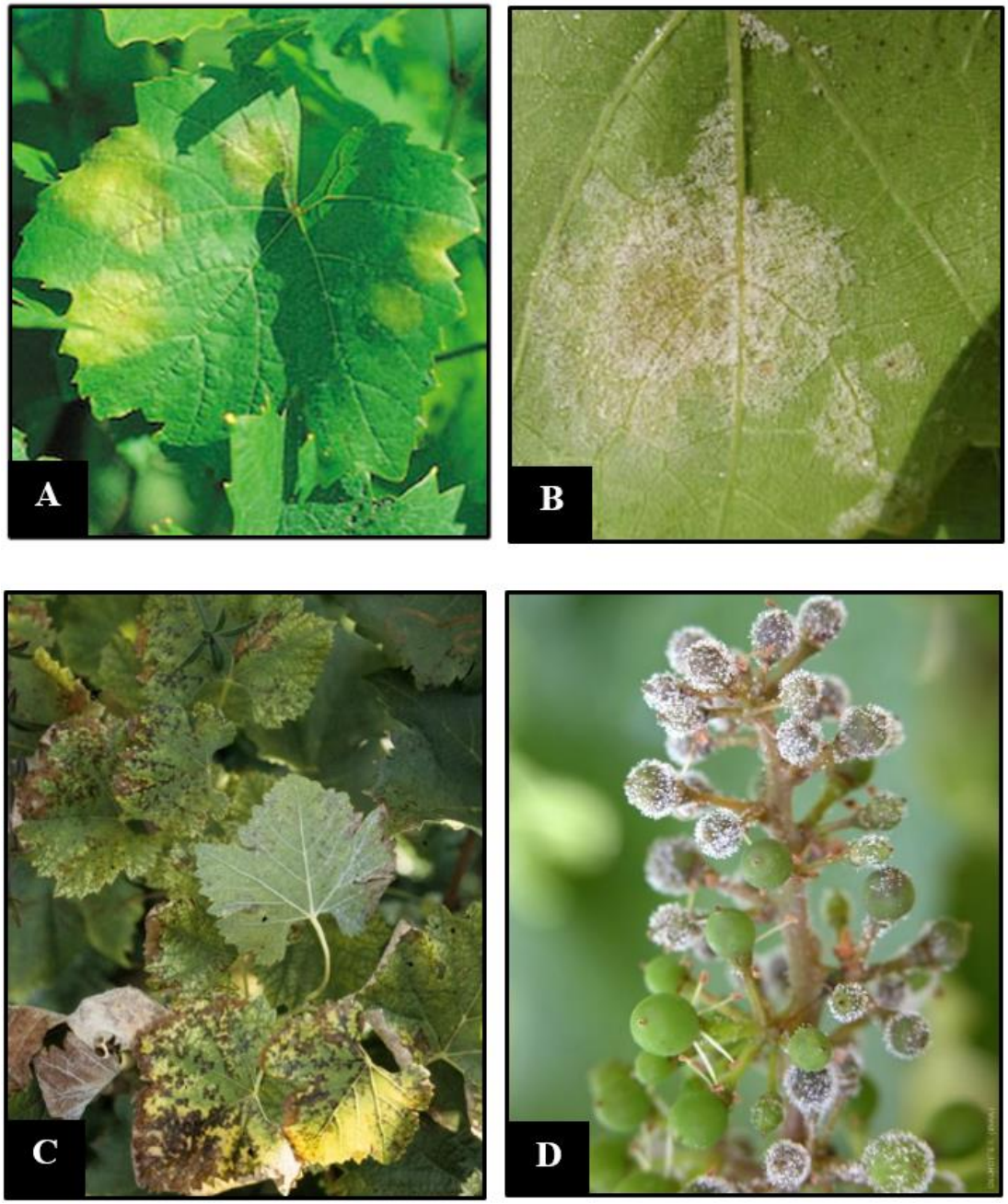

Figure 9. Mildiou colonisant la face supérieure de la feuille, aspect en « tâches d'huile » (A), « feutrage blanc » sur la face inférieure (B) visible en début de saison. Symptôme de mosaïque de mildiou sur la face supérieure de la feuille observable en fin de saison (C) et fructifications apparentes de l'oomycète, *Plasmopara viticola*, sur les grappes (D) (Ephytia, INRA).

4.1.2 L'oïdium – *Erysiphe necator*

Comme pour le mildiou, l'oïdium, ou maladie du blanc de la vigne, est une maladie cryptogamique aérienne originaire d'Amérique du nord. L'oïdium a été introduit en Europe, plus précisément dans le Sud-Est de l'Angleterre, en 1845 dans des serres où la vigne était plantée, puis il s'est répandu en quelques années dans toute l'Europe. Il est actuellement présent dans tous les vignobles du monde (Dubos, 2002, Viret et Gindro, 2014).

Cette maladie est provoquée par un pathogène biotrophe obligatoire, *i.e. Erysiphe necator*, strictement inféodé aux *Vitaceae* de genre *Ampelopsis*, *Cissus*, *Parthenocissus* et *Vitis* (Viret et Gindro, 2014). Il appartient au groupe des Ascomycètes, *e.g.* groupe de champignons caractérisé par la formation d'asques contenant des ascospores durant le cycle sexué (Viret et Gindro, 2014). Cette maladie a un impact significatif sur la production annuelle mais aussi sur la qualité du vin (Rousseau et *al*., 2008) en absence de moyens de lutte efficace.

Les attaques peuvent être précoces et les baies peuvent être détruites (Viret et Gindro, 2014). La maladie se manifeste principalement sur les feuilles par l'apparition de tâches diffuses avec un aspect de poussières grisâtres mais la décoloration est moins marquée que dans le cas du mildiou.

Un feutrage grisâtre apparait à la face inférieure des feuilles (Fig. 10A). La partie attaquée du limbe croit plus lentement provoquant la déformation de la feuille qui se crispe (Fig. 10C). Sur les sarments, le même revêtement poussiéreux grisâtre se développe. Les grappes et les grains contaminés se recouvrent d'une fine poussière grisâtre qui provoque des nécroses noires (Fig. 10D). La croissance des parties atteintes est arrêtée, alors que la partie du grain sain continue de croître, provoquant par conséquent l'éclatement des baies et l'apparition des pépins. Ces lésions sont alors favorables à une autre maladie, la pourriture grise (*Botrytis cinerea*), ce qui va compromettre la récolte.

4.1.3 La pourriture grise et pourriture noble – *Botrytis cinerea*

La pourriture grise de la vigne est causée par un ascomycète appelé *Botrytis cinerea* (Pers, 1794). C'est un champignon omniprésent dans le monde sous pratiquement tous les climats et il attaque la plupart des productions fruitières, dont les vignobles (Dubos, 2002). Il s'agit d'un organisme nécrotrophe (Mouria et *al*., 2013) capable de pénétrer dans les tissus blessées de la vigne entraînant la mort progressive des tissus infectées sur lesquels la pourriture grise peut se nourrir, croître et se reproduire.

En conditions humides (90 à 95 %) et froides (températures comprises entre 17 et 23°C), le pathogène fongique infecte les bourgeons et les grappes en formant une masse cotonneuse grisâtre.

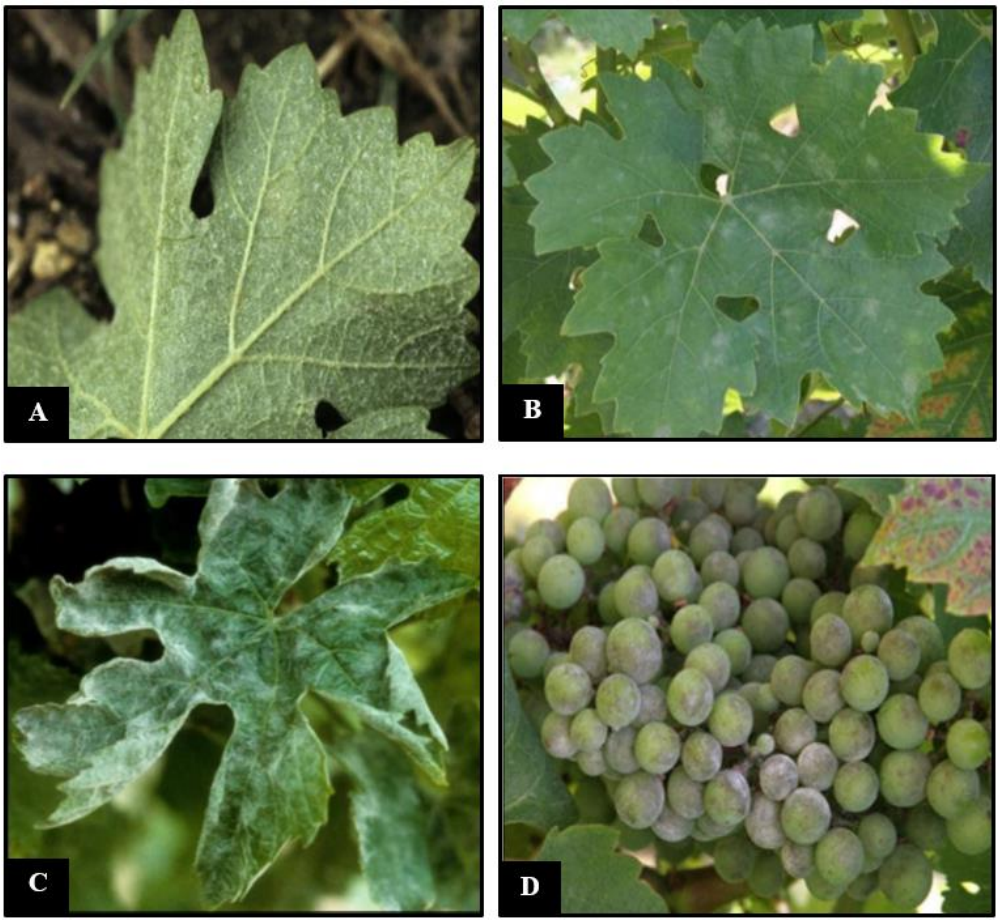

Figure 10. Symptômes d'oïdium. Tâches duveteuses sur la face inférieure (A) et sur la face supérieure de la feuille (B). Symptôme sur feuilles fortement attaquées par l'oïdium (C). Les baies se couvrent d'une poussière blanchâtre (D) (Ephytia, INRA).

Les symptômes apparaissent sous forme de tâches nécrotiques brunâtres (Fig. 11) sur le bord des limbes puis s'étendent à la totalité de la feuille et provoquent finalement la chute du feuillage. Pour les grappes le champignon s'attaque au pédoncule et provoque la chute d'une partie ou de la totalité de celles-ci.

Les baies sont surtout sensibles au stade de la véraison où le développement d'une coloration brune pour les cépages blancs et l'apparition d'un épais feutrage gris sont observés (Fig. 11).

Cette maladie entraîne des pertes de rendement pouvant aller jusqu'à 40% (Dubos, 2002) mais elle altère également les qualités organoleptiques des vins (Darriet et *al*., 2001).

Cependant, *B. cinerea* est aussi l'agent responsable de la « pourriture noble » qui se développe quand les ceps de vignes sont exposés à des conditions plus sèches. Dans ce cas, le pathogène assèche les baies et les grappes deviennent en partie déshydratées. Ce processus de déshydratation partielle entraîne une accumulation des sucres dans les baies, ce qui est généralement exploité par

les viticulteurs comme ceux du Sauternais (région de Bordeaux) ou du Tokay (Hongrie) pour la production de vins blancs liquoreux prestigieux.

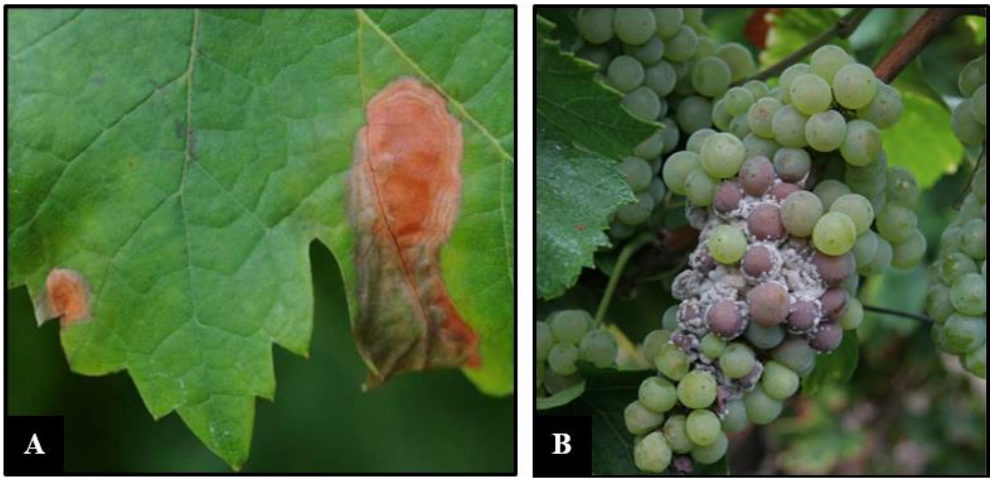

Figure 11. Symptômes caractéristique de *Botrytis cinerea* sur feuilles, tâches rouges brunes à la périphérie du limbe, (A) et sur grappes qui se recouvrent de conidiophores et prennent une coloration marron (B) (Ephytia, INRA).

4.2 Méthodes de protection vis-à-vis des maladies cryptogamiques aériennes

4.2.1 La lutte prophylactique

Les pratiques culturales peuvent réduire la sévérité des maladies cryptogamiques aériennes telles que l'oïdium, le mildiou et la pourriture grise ; et améliorer l'efficacité de la lutte chimique, seule méthode efficace pour l'instant disponible pour lutter contre ces maladies. Ces pratiques culturales doivent en effet tenir en compte de tous les facteurs environnementaux qui ont une action favorable, soit sur le développement des champignons pathogènes, soit sur la sensibilité induite de la vigne (Dubos, 2002).

Parmi ces méthodes prophylactiques on peut citer (Dubos, 2002 et Viret et Gindro, 2014) :

(i) L'aération de la zone des grappes (palissage, épamprage, effeuillage).

(ii) La maitrise de la vigueur (fertilisation, enherbement, choix du porte–greffe et du cépage).

(iii) L'élimination des pampres infectés, de tous les rejets, gourmands, semis de pépins, etc...

(iv) La suppression des repousses proches du sol sur le tronc.

(v) La lutte contre les autres maladies ou ravageurs, car ceux-ci peuvent générer des portes d'entrées pour *B. cinerea* (agent causal de la pourriture grise) dans la baie de raisin.

(vi) La lutte contre les vers de la grappe.

Ces méthodes ont une importance primordiale car elles facilitent le dépôt des produits phytosanitaires sur les grappes et elles évitent aussi la création de zones microclimatiques favorables au développement des maladies (Viret et Gindro, 2014).

4.2.2 La lutte chimique

Même avec une lutte prophylactique bien réalisée, la protection chimique à l'égard de ces trois maladies reste indispensable pour garder la vigne dans un état sanitaire satisfaisant. La lutte chimique est raisonnée de façon à limiter l'apparition d'agents pathogènes résistants à certaines matières actives composant les fongicides. Il est fortement recommandé de limiter le nombre d'applications annuelles de fongicides d'une même famille chimique et d'alterner les matières actives. La gestion raisonnée passe également par l'utilisation de modèles de prévision des risques. Plusieurs ont été développés par les scientifiques dont Hill (1989) et Schultz (1992). Ils permettent de prédire les infections en fonctions de paramètres climatiques (Delière et *al.*, 2010 ; Viret et Gindrot, 2014) et via les observations des premières attaques au vignoble.

Pour le mildiou, la lutte chimique est essentiellement préventive (trois à dix traitements par an) (Viret et Gindro, 2014). On distingue différents types de fongicides selon leurs caractéristiques de mouvement (i) les fongicides de contacts (ii) les fongicides pénétrants ou intra-cuticulaires et (iii) les fongicides systémiques.

Pour l'oïdium, la lutte doit être préventive à partir du stade 2 à 3 feuilles jusqu'à la véraison (Dubos, 2002) afin d'empêcher le début de la maladie sur les feuilles (Viret et Gindro, 2014). Le fongicide de base est le soufre, il a d'abord été utilisé aux Etat-Unis en 1829, puis pour la première fois en France, en 1850, dans les jardins du château de Versailles (Dubos, 2002). Il est appliqué en poudrage ou en pulvérisation combinée avec un produit anti-mildiou (Dubos, 2002). Ce produit est phytotoxique à des températures élevées (>35°C). Outre le soufre, des fongicides pénétrants comme les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols, les phénoxyquinoléines et les strobilurines sont aussi utilisés pour lutter contre l'oïdium (Dubos, 2002).

Pour la pourriture grise, la lutte chimique est essentiellement préventive et le choix des fongicides doit tenir compte de l'apparition des souches résistantes de *B. cinerea* aux fongicides appliqués précédemment. Pour cela il faut impérativement alterner les fongicides avec des modes d'action différents (Dubos, 2002 ; Viret et Gindro, 2014).

Pour protéger les ceps des attaques de *B. cinerea*, les fongicides doivent être appliqués (i) au stade de la floraison-début nouaison, afin d'empêcher l'installation du champignon pathogène sur les débris floraux et prévenir les contaminations latentes , (ii) à la fermeture des grappes pour

détruire l'inoculum de *B. cinerea*, (iii) au stade de la véraison et (iv) trois à quatre semaines avant la date probable de la vendage (Dubos, 2002 ; Viret et Gindro, 2014).

4.3 Les maladies du bois de la vigne

Les maladies du bois de la vigne (MDBs) se distinguent des maladies racinaires, foliaires et des organes fructifères par leur capacité à affecter les tissus ligneux de la plante hôte, *i.e.* tronc et bras. Elles regroupent trois pathologies majeures : l'esca, l'eutypiose et les chancres à Botryosphaeriaceae (Larignon et *al*., 2001). Les MDBs affectent principalement les ceps âgés de 15 à 25 ans, mais les vignes plus jeunes et plus âgées peuvent aussi être atteintes (Viret et Gindro, 2014). Elles sont considérées comme très redoutables et dommageables car les champignons impliqués attaquent les organes pérennes de la vigne et conduisent fréquemment à la mort du cep (Larignon et *al*., 2009). Ces maladies sont en recrudescence (Larignon et *al*., 2009) car il n'existe plus de traitement efficace depuis l'interdiction de l'arsénite de sodium en 2001 en raison de sa toxicité pour l'homme et l'environnement. Elles sont donc devenues une préoccupation majeure pour la filière vitivinicole en France et dans le monde (Bertsch et *al*., 2013).

Les symptômes externes de ces maladies sont divers et se manifestent sur la partie herbacée sous deux formes : la forme lente conduisant à l'affaiblissement de la plante pendant plusieurs années, et la forme sévère, appelée apoplectique, qui provoque la mort des ceps en quelques jours. L'expression de ces symptômes dépend de facteurs biotiques, plusieurs champignons pathogènes étant impliqués : *Diplodia seriata, Eutypa lata, Neofusicoccum parvum, Phaeoacremonium minimum* (anciennement *P. aleophilum*), *Phaeomoniella chlamydospora*,.... La sensibilité du cépage, la tolérance du porte-greffe, l'âge du cep et/ou le nombre de plaies de taille sont des portes d'entrée pour les micro-organismes pathogènes (Larignon, 2012) et influent sur le développement de ces maladies. Des facteurs abiotiques tels que la température, la disponibilité en eau, la date de taille et de récolte sont également impliqués dans le développement des MDBs (Dubos, 2002 ; Kuntzmann et *al*., 2013). Une dégradation du bois sera alors visible ; elle se traduit par l'apparition de nécroses pouvant se développer et aboutir à la formation de chancres. Selon leur gravité ou la période pendant laquelle elles se manifestent, les MDBs peuvent toucher les inflorescences ou les fruits.

4.3.1 L'esca

4.3.1.1 Historique

L'esca est une des principales maladies du bois de la vigne à travers le monde (Chiarappa, 1959 ; Valtaud et *al*., 2009). Elle est particulièrement présente dans les vignobles de l'hémisphère nord (Larignon et *al*., 2009). Elle a d'abord été décrite sous sa forme apoplectique (Marès, 1865) et son origine fut longtemps indéterminée et attribuée à un désordre physiologique désigné sous le nom de folletage (Ravaz, 1898). Ce n'est qu'au début du 20ème siècle qu'elle a été attribuée à un cortège de champignons et de ce fait, distinguée du folletage (Ravaz, 1909). L'esca est un terme d'origine languedocienne ou provençal qui signifie amadou (pourriture blanche), il était désigné auparavant sous le nom de « iska » en Grèce ou de yecka en Italie.

4.3.1.2 Étiologie

L'esca est une des plus anciennes maladies décrite sur la vigne (Dubos, 2002 ; Viret et Gindro, 2014). Pourtant, les agents pathogènes impliqués dans cette pathologie ne sont pas encore clairement identifiés et les facteurs déclenchant, pas complètement élucidés. L'étiologie de l'esca apparaît donc comme étant complexe. Cette maladie se manifeste sous deux formes : une dite lente et l'autre dite foudroyante ou apoplectique. Les symptômes foliaires (Fig. 12A, B) associés à la forme lente se caractérisent par des décolorations spécifiques, le terme faciès « tigré » des feuilles est évoqué, il évolue progressivement vers un brunissement et un dessèchement des limbes (Viala, 1926 ; Arnaud et Arnaud, 1931; Chiarappa, 1959; Larignon et Dubos, 1997).

La forme apoplectique (Fig. 12D) se caractérise quant à elle, par un dessèchement total ou partiel des organes aériens, *i.e.* bras, rameaux, feuilles et grappes, en l'espace de quelques heures ou quelques jours. Ces symptômes apparaissent consécutivement à une pluie d'orage ou à un excès d'eau dans le sol associés à des températures élevées et à un vent chaud. Ces conditions climatiques engendreraient chez le végétal un déséquilibre entre l'absorption et la transpiration qui serait alors fatal pour les vignes atteintes d'esca (Surico et *al*., 2006).

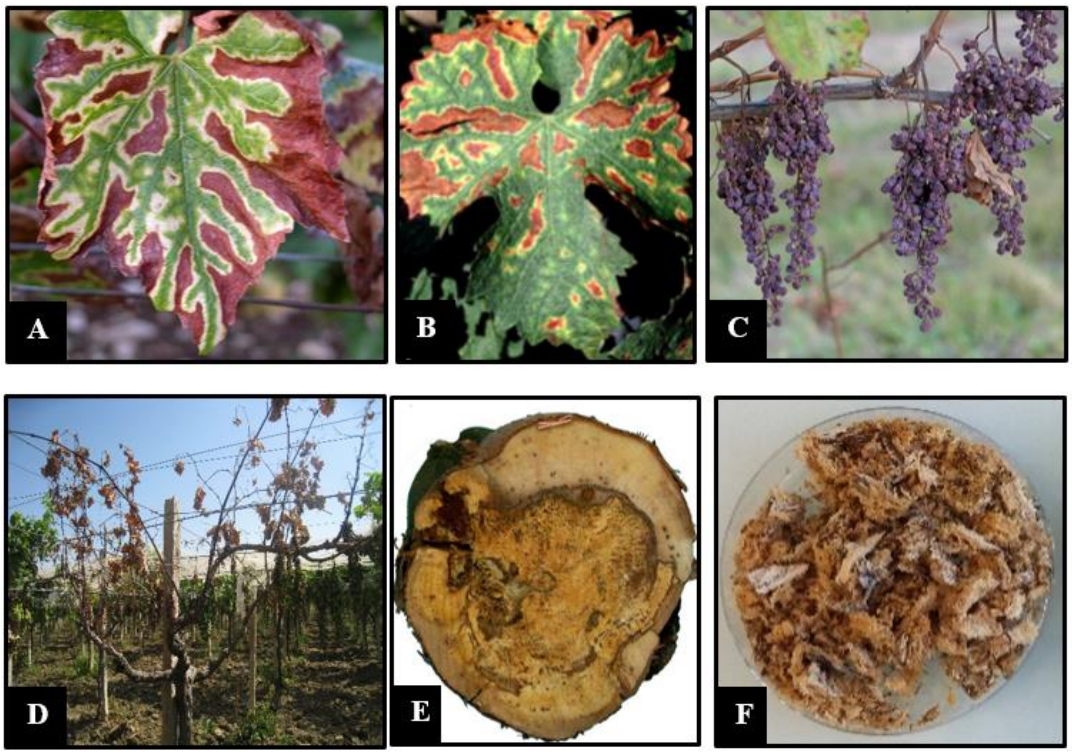

Figure 12. Symptômes foliaires associés à la forme lente de l'esca sur cépage noir (A) et blanc (B) (Gerbore, 2009). Flétrissement des baies (C, Ephytia INRA). Forme apoplectique (D) (Rezgui, 2013). Nécrose tendre « Amadou » sur bois (E, ephytia, INRA) et sur boite de Petri (F) (Rezgui, 2015).

Pour Luini et *al*. (2010), les symptômes foliaires seraient la conséquence d'une action des toxines émises par les champignons présents dans le bois et véhiculées jusqu'aux organes herbacés par les vaisseaux conducteurs. Il est aujourd'hui admis que deux processus conduisent à une dégradation du bois caractéristique de l'esca (Larignon et Dubos, 1997). Le premier conduit à la formation d'une nécrose centrale causée par trois espèces fongiques *: Phaeomoniella chlamydospora* (Crous et Gams, 2000) pénètrerait d'abord par les plaies de taille et formerait des ponctuations noires (Larignon, 2004). Puis *Phaeoacremonium minimum* (anciennement *P. aleophilum*) (Crous et *al*., 1996) formerait une nécrose de couleur brune qui, en se joignant progressivement aux ponctuations noires, donnerait une nécrose brune et dure. Enfin, *Fomitiporia mediterranea* (Fischer, 2002), colonise la nécrose en position centrale et la dégrade en une pourriture blanche, claire et tendre (amadou). Le second processus fait intervenir deux espèces fongiques responsables de nécroses sectorielles : *Eutypa lata* qui serait à l'origine d'une nécrose brune, celle-ci étant par la suite colonisée par *F. mediterranea*. L'action combinée de ces deux champignons aboutit à la formation d'une nécrose claire et tendre, l'amadou (Fig. 12E, F).

La présence de nécroses importantes dans le bois n'est pas systématiquement associée à l'expression de symptômes foliaires, elle est cependant corrélée positivement à la mortalité des ceps et à leur état de dégradation avancée (Limiñana et *al*., 2009). L'esca est typiquement associé à la formation d'amadou dans les ceps (Maher et *al*., 2012). Les baies des ceps atteints de l'esca présentent généralement un aspect sain mais peuvent subir un retard dans la maturation, ou alors flétrir et se momifier (Fig. 12C) (Larignon, 2005).

Selon Lafon (1921), le pourcentage de ceps atteints d'apoplexie varie suivant les différents modes de conduite de la vigne. Par exemple, les systèmes qui causent des grosses plaies de taille favoriseraient le développement de l'esca. D'une façon générale toutes les opérations entraînant des blessures, *e.g.* suppression des bras morts, modifications du mode de conduite par la mise en œuvre de vendage mécanique, … seraient favorables à la maladie (Dubos, 2002).

4.3.2 Le Black Dead Arm (BDA)

4.3.2.1 Historique et symptômes

Le Black Dead Arm est une maladie de dépérissement connue depuis longtemps sous le nom d'apoplexie lente et elle est souvent confondue avec le syndrome de l'esca car la symptomatologie est très similaire (Arnaud et Arnaud, 1931). Cette maladie est probablement d'origine européenne (Dubos, 2002), elle fut décrite pour la première fois en Hongrie en 1974 par Lehoczky puis en Italie (Cristinzio, 1978 ; Rovesti et Montermini, 1987), un peu plus tard le groupe de Larignon l'a décrite en France en 2000. Elle a été décrite dans les principales régions viticoles du monde (Larignon et Dubos, 2001), y compris en Tunisie (Ben Ghanaya-Chakroun et *al*., 2014 ; Chebil et *al*., 2014).

Selon Lecomte et *al*. (2006), le faciès BDA est une phase transitoire de l'expression de la forme lente de l'esca.

De nombreux symptômes sont associés à cette maladie: des tâches foliaires (Fig. 13A, B), mortalité de bourgeons, dépérissement de rameaux, nécroses de baies. Mais principalement les symptômes du BDA sont en relation avec une bande brune dans le bois située sous l'écorce pouvant aller jusqu'au niveau de point de greffe, voire du porte greffe (Larignon et Dubos, 2001). Cette bande brune (Fig. 13C) peut se former de part et d'autre d'une nécrose sectorielle et évoluer en formant, soit des tâches noires, soit des chancres (Larignon et Dubos, 2001). Il convient de noter l'extrême variabilité de l'expression des symptômes d'une année à l'autre et les différences de sensibilité observées selon les cépages.

Concernant l'influence des facteurs environnementaux, la manifestation des symptômes foliaires est fluctuante d'une année à l'autre, les étés doux et pluvieux sont favorables à leur expression.

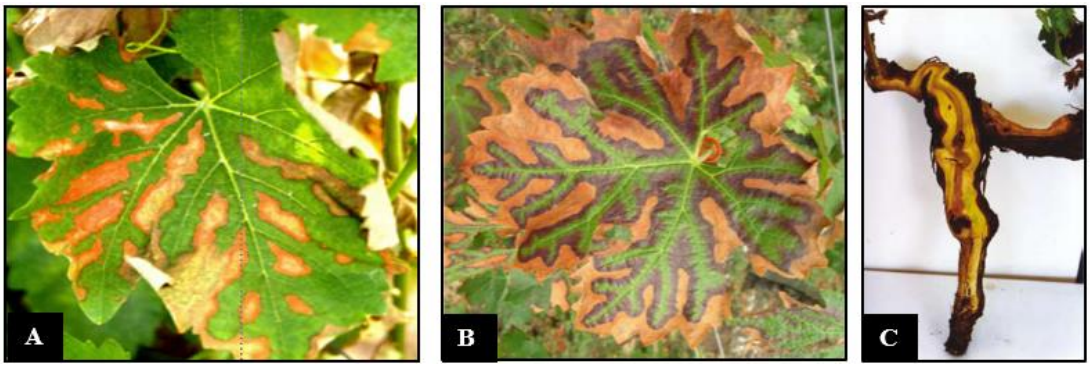

Figure 13. Symptômes foliaires du BDA sur cépages blanc (A) (Rezgui, 2013) et noir (B) (Gerbore, 2009). Bande jaune orangée caractéristique du BDA (C) selon Larignon (2008).

4.3.2.2 Étiologie

Le BDA est associé à deux champignons, *i.e. Botryosphaeria obtusa* et *Botryosphaeria stevensii* (Dubos, 2002), dont le cycle biologique est encore mal connu.

(i) *B. obtusa* **(**anamorphe : *Diplodia seriata*) est un ascomycète de la famille des Botryosphaeriaceae (Larignon et *al*., 2001 ; Viret et Gindro, 2014) qui a été décrit pour la première fois par Schweinitz en 1832 sous le nom de *Sphaeria obtusa*, avant d'être renommé *B. obtusa* par Shoemaker en 1964.

(ii) *B. stevensii*, fait partie des ascomycètes de la famille des Botryosphaeriaceae (Dubos, 2002).

Pour ces deux pathogènes, la dissémination se fait par voie aérienne par temps humide durant la période végétative de la vigne. L'inoculum se conserve sous la forme de pycnides sur les organes des ceps atteints : le tronc, les bras ainsi que sur les plaies et les bois de taille laissés au sol (Dubos, 2002). Cette maladie entraine des pertes quantitatives de récolte liées à l'absence des ceps et au dessèchement des inflorescences sur les ceps attaqués. Comme toutes les maladies du bois, le BDA entraine un dépérissement des ceps et une dépréciation du patrimoine viticole (Dubos, 2002).

4.3.3 L'eutypiose - *Eutypa lata*

4.3.3.1 Historique et symptômes

L'eutypiose est signalée dans les vignobles français depuis 1890 sous le nom d'une maladie nommée « Cottis » dont les symptômes rappellent l'eutypiose actuelle. En effet, la forme actuelle n'a été reconnue qu'à partir de l'année 1974 pour envahir, quatre ans plus tard, tous les vignobles français (Dubos et *al*., 1980). Cette maladie attaque de nombreuses plantes d'intérêt agronomique dans les régions à climat tempéré et méditerranéen, *e.g.* abricotier, amandier, citronnier, figuier, kaki, prunier, pêcher, pommier, poirier, noisetier… (Viret et Gindro, 2014). L'eutypiose a été identifiée sur *Vitis vinifera* dans le Sud de l'Australie en 1957 par Carter. Actuellement, elle atteint la plupart des vignobles mondiaux (Larignon et Dubos, 2001).

Les symptômes de l'eutypiose se manifestent au printemps par un rabougrissement des rameaux (entre-nœuds courts et réguliers) qui présentent des feuilles chlorotiques, frisottées, crispées, parfois déchiquetées, avec des nécroses marginales qui peuvent se généraliser sur l'ensemble du limbe (Fig. 14A). Les inflorescences peuvent se dessécher avant la floraison ou les grappes être constituées de petites baies souvent apyrènes (Dubos, 2002). L'eutypiose se traduit également par la mort d'un bras d'où le nom de maladie du bras mort.

Chez les ceps atteints d'eutypiose, une coupe transversale au niveau du bois des bras ou du tronc permet de voir la présence d'une nécrose brune et dure en position sectorielle (Fig. 14B).

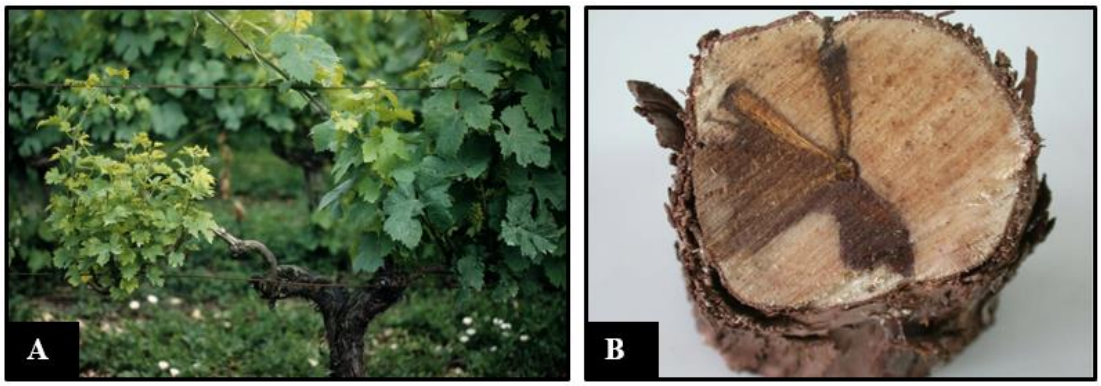

Figure 14. Croissance ralentie, entre-nœuds courts et feuilles crispées et chlorotiques caractéristiques de l'eutypiose (A). Nécrose brune sectorielle au niveau du bois (B) (Ephytia, INRA).

4.3.3.2 Étiologie

L'agent causal de l'eutypiose est un champignon ascomycète de la famille des Diatrypaceae (Viret et Gindro, 2014) appelé *Eutypa lata*. Il était auparavant désigné sous le nom d'*Eutypa armeniacae* (Carter, 1957 ; Rolshausen et *al*., 2004) qui est également un agent responsable de l'apoplexie de l'abricotier. *E. lata* se caractérise par des périthèces qui se développent sur le bois mort dans les zones où l'écorce est exfoliée (Dubos, 2002). Ce pathogène vasculaire du chancre a été détecté chez environ 88 espèces de dicotylédones ligneuses (Berraf and Peros, 2005 ; Wenneker et *al.*, 2006), dont beaucoup d'espèces forestières et ornementales. Il n'est cependant pas certain que tous les isolats des plantes hôtes natives soient pathogènes ; la pathogénicité d'*E. lata* a été confirmée chez la vigne, l'abricotier, les cerisiers et l'olivier (Rumbos, 1993).

L'eutypiose induit des pertes économiques importantes pour les viticulteurs soucieux de maintenir le potentiel qualitatif de leurs patrimoines viticoles (Dubos, 2002).

5. Les stratégies de lutte contre les maladies du bois de la vigne

5.1 La lutte culturale

Actuellement, il n'existe pas de méthodes curatives permettant d'éliminer les champignons dans le bois. La mise en œuvre de méthodes prophylactiques reste donc le meilleur moyen de limiter le développement des MDBs en agissant sur (i) l'environnement et (ii) l'hôte. (i) Il est possible de minimiser les sources d'inoculum via le retrait des souches malades (bois mort) de la parcelle ; il est conseillé de ramasser les bois de taille atteints et de les brûler (Dubos, 2002 ; Lecomte et *al*., 2004). (ii) La date et méthode de la taille doivent être bien choisie. Il est par exemple conseillé d'éviter la formation de grosses plaies de taille pour limiter la pénétration des spores des champignons dans la plante. Si un cépage est sensible aux MDBs, la taille doit être réalisée le plus tard possible au moment de la montée de sève (période dite des « pleurs ») lorsque les blessures sont moins réceptives aux attaques fongiques (Dubos, 2002). Il est aussi recommandé de protéger les plaies aussitôt après la taille pour empêcher la contamination du cep par des champignons. Certains systèmes de taille, comme la taille Guyot-Poussard, ont montré qu'ils pouvaient limiter la progression de l'esca en conservant des trajets de sève indemnes à l'opposé des plaies de taille (Lafon, 1921 ; Geoffrion et Renodin, 2002 ; Bruez, 2013).

Deux techniques prophylactiques curatives, *i.e.* le recépage et le regreffage (Creaser et Wicks, 2004), ont montré des résultats intéressants pour lutter contre les MDBs. Dans certains cas, elles ont permis de reconstituer un cep et de restaurer le potentiel qualitatif initial en 2 ans (Dubos, 2002) :

(i) Le recépage est appliqué après repérage au printemps des premiers symptômes des MDBs. Il consiste à couper au moment de la taille, le tronc à un niveau suffisamment bas (15 à 30 cm de hauteur) pour conserver les trajets de sève fonctionnels et qu'il n'y ait plus de nécroses dans le bois. Après la coupe, la section doit être protégée pour éviter une contamination éventuelle et le gourmand doit être tutoré (Dubos, 2002).

De nombreux pays se prêtent à cette technique, y compris la Tunisie. Mais le taux de réussite est très variable : pour les parcelles jeunes et vigoureuses, le taux de reprise est très élevé (jusqu'à 90%) alors que pour les parcelles âgées et peu vigoureuses, les résultats sont parfois inférieurs à 5% (Dal, 2013).

(ii) Le regreffage est appliqué dans le cas où les ceps atteints par les MDBs ont un porte-greffe sain. Plutôt que d'arracher le cep, le regreffage va consister à greffer un nouveau plant sur le porte-greffe, ce qui permettra de conserver le système racinaire de la souche initiale. Cette méthode peut être appliquée durant la période du printemps jusqu'à fin juin (Dal, 2013). Le taux de réussite est de l'ordre de 75% pour des vignes de moins de 25 ans, au-delà, l'opération devient plus aléatoire (Dubos, 2002).

5.2 La lutte chimique

À l'aube du 20ème siècle, la lutte contre l'esca a trouvé son originalité dans la découverte de l'arsénite de sodium, un produit très efficace pour lutter contre les MDBs (Ravaz, 1919; Moreau et Vinet, 1923). Il a cependant été interdit en 2001 en Europe, du fait de sa toxicité pour l'Homme et l'environnement. Depuis, un taux croissant de mortalité des ceps atteints par cette maladie a alors été enregistré (Bruez et *al*., 2013).

D'autres fongicides tels que le carbendazime (un produit de la famille des benzimidazoles) et le bénomyl (famille des carbamates) en traitement foliaire par pulvérisation, en injection dans le tronc, en badigeon ou pulvérisation sur les plaies de taille (Bester et *al*., 2007; Sosnowski et *al*., 2008 ; Gramaje et Armengol, 2011 ; Bertsch et *al*., 2013), ont également été interdits malgré leur efficacité en raison de leur toxicité sur l'Homme (effet cancérigène) et l'environnement (Fourie et Halleen, 2005, 2006; Sosnowski et *al*., 2008 ; Pitt et *al*., 2010; Rolshausen et *al*., 2010; Berstch et *al*., 2013).

D'autres essais menés jusqu'à maintenant par différents laboratoires dans le monde, n'ont pas permis de trouver des méthodes de lutte chimiques préventives ou curatives satisfaisantes, soit parce que les produits testés n'étaient pas suffisamment efficaces, soit parce que leur mode d'application n'est pas réalisable par le viticulteur (Larignon et *al*., 2009).

Plusieurs expérimentations ont, par ailleurs, été effectuées sur le matériel végétal de propagation, en se basant sur l'idée que les champignons associés à l'esca et au BDA sont des champignons qui se propagent via ce matériel (Larignon et *al*., 2006). Le traitement à l'eau chaude à une température de 50°C pendant 30 minutes réduit l'incidence de *P. chlamydospora* (Edwards et *al*., 2004 ; Fourie et Halleen, 2004) mais il n'a pas de réelles incidences sur la réduction des MDBs après plusieurs années (E. Bruez, communication personnelle).

5.3 La lutte biologique

La prise de conscience des effets néfastes des produits chimiques sur la santé humaine et l'environnement ainsi que la volonté politique d'en minimiser l'usage abusif ont créé les conditions nécessaires au développement de nouvelles alternatives de lutte telles que la lutte biologique, ou biocontrôle, à l'aide de micro-organismes. En Europe, 14 genres microbiens (champignons, oomycètes et bactéries) sont actuellement inscrits au règlement européen n°1107/2009 mais la tendance est à une augmentation de l'utilisation de ces produits.

L'Organisation Internationale de la Lutte Biologique (OILB) définit la protection biologique comme étant : « L'utilisation d'organismes vivants afin de prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs » (Lepoivre, 2003). Elle visera donc à mettre en relation deux organismes naturels, à savoir la cible représentée par l'organisme nuisible affectant la plante (pathogène) et l'agent de protection (antagoniste) ayant comme objectif la mort ou la limitation du développement du pathogène (Sutton, 1995). De plus, le souci d'avoir une meilleure qualité de produit et l'insuccès des diverses méthodes de lutte, fait de la lutte biologique une réalité en agriculture. Parmi les produits de biocontrôle utilisés, on peut citer : les micro-organismes antagonistes, les extraits microbiens ou de plantes, les substances naturelles.

5.3.1 Agents de lutte biologique

5.3.1.1 Les substances naturelles

Des études antérieures (Octave et *al*., 2005 ; Nascimento et *al*., 2007) ont démontré que certaines molécules naturelles, *e.g.* le chitosane ou la cystéine, peuvent inhiber la croissance mycélienne *in vitro* ou *in planta* de plusieurs champignons associés aux MDBs.

Aït Barka et *al*. (2004) et Nascimento et *al*. (2007) ont ainsi montré que le chitosane pouvait déclencher le système de défense de la plante hôte et stimuler la croissance de la plante. Cette molécule a un pouvoir antifongique, elle est capable de réduire la croissance mycélienne *in vitro* de champignons pathogènes impliqués dans les MDBs, *i.e. Botryosphaeria* sp., *Phomopsis* sp., *E.*

lata, P. chlamydospora et *Fomitiporia* sp., et de réduire l'incidence de la maladie *in planta* (Nascimento et *al*., 2007). Le chitosane appliqué en pulvérisation sur feuilles de vigne réduit le nombre de filaments de *P. chlamydospora* (Nascimento et *al*., 2007). La cystéine est, quant à elle, capable d'inhiber la croissance mycélienne de *E. lata* (Octave et *al.*, 2005).

5.3.1.2 Champignons et oomycètes

La protection biologique des plants de vigne contre les champignons impliqués dans les MDBs peut se faire à l'aide d'agents microbiens provenant de la rhizosphère comme les *Trichoderma* spp., (Di Marco, 2003 ; Fourie et Halleen, 2005 ; Amreen and Kumar, 2012; Lee et *al*., 2012; Tuao Gava et Leal-Menezes, 2012). Les *Trichoderma* spp. sont des biofongicides efficaces sur plants de vigne vis-à-vis des pathogènes fongiques *P. chlamydospora* et *Phaeoacremonium* spp. (Fourie et *al*., 2001, Di Marco et *al*., 2004, Kotze et *al*., 2011) et en protection des plaies de taille vis-à-vis d'*E. lata* (John et *al*., 2005). Les *Trichoderma* spp. inhibent les pathogènes fongiques via le processus de mycoparasitisme ou de compétition pour les nutriments et l'espace (Di Marco et *al*., 2004 ; Fourie et Halleen, 2004, 2006 ; John et *al*., 2005 ; Di Marco et Osti, 2007 ; Halleen et *al*., 2010 ; Kotze et *al*.; 2011 ; Kovács et *al*., 2014 ; Mounier et *al*., 2014 ; Aloi et *al*., 2015). Plusieurs souches de *Trichoderma* sont homologuées et commercialisées. C'est le cas du produit nommé Biotricho® contenant une souche de *T. harzianum*, du Vinevax contenant trois souches de *T. harzianum* et trois souches de *T. atroviride* (Kotze et *al*., 2011). Le produit Esquive WP® a récemment été homologué en France contre l'esca et l'eutypiose (Mounier et *al*., 2014). D'autres micro-organismes aux propriétés antagonistes ont également été testés, *Fusarium lateritium, Pythium oligandrum* (Christen et *al*., 2005 ; Yacoub et *al*., 2016).

En ce qui concerne *P. oligandrum*, c'est un oomycète naturellement présent dans la rhizosphère des ceps de vigne de la région de Bordeaux (Gerbore, 2013). Il peut exercer des effets, soit directs sur les champignons pathogènes, soit indirects en stimulant les systèmes de défense de la plante, ce qui leur permet de résister aux infections contre de nombreux agents pathogènes (Takenaka et *al*., 2006, Mohamed et *al*.; 2007).

Une étude récente menée par Yacoub et *al*. (2016) a montré la capacité de cet oomycète à réduire le pourcentage de nécroses (50%) dues à *P. chlamydospora* sur boutures de cv. Cabernet Sauvignon et à induire plusieurs gènes du système de défense de la vigne.

5.3.1.3 Les bactéries

Plusieurs bactéries ont été utilisées comme agent de biocontrôle contre les MDBs (Ferreira et *al*., 1991 ; Schmidt et *al*., 2001 ; Compant et *al*., 2013). Elles peuvent, ainsi que leurs métabolites secondaires, inhiber ou réduire la croissance des pathogènes impliqués dans les maladies du bois de la vigne. Ces bactéries agissent directement ou indirectement sur les pathogènes (Fig. 15) via plusieurs mécanismes de lutte biologique : l'antibiose, la compétition pour les niches et les nutriments ou par la stimulation du système immunitaire de la plante hôte (Lugtenberg et kamilova, 2009 ; Compant et *al*., 2013).

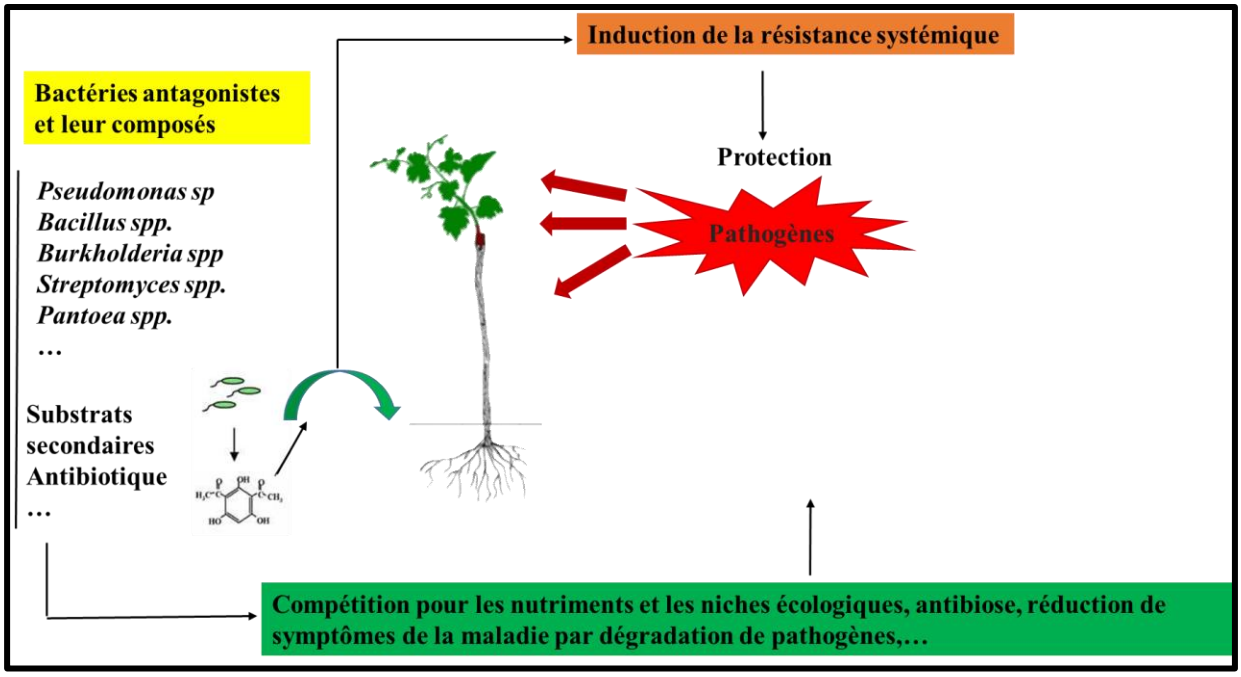

Figure 15. Modes d'action des bactéries antagonistes contre les attaques des pathogènes fongiques (Compant et *al*., 2013).

Bacillus subtilis est une bactérie utile pour contrôler les maladies des plantes y compris les MDBs (Compant et *al*., 2013). Plusieurs études ont montré que cette espèce est capable de réduire/inhiber la croissance mycélienne d'un large spectre d'agents phytopathogènes impliqués dans les MDBs, *i.e. Diplodia seriata, E. lata, Lasidioploidia theobromae, Neofusicoccum australe, N. parvum, P. chlamydospora, Phomoposis viticola, P. aleophilum* (Ferreira et *al*., 1991 ; Schmidt et *al*., 2001 ; Alfonzo et *al*., 2008, 2009 ; Kotze et *al*., 2011, Compant et *al*., 2013). *B. subtilis* inhibe en effet le développement de l'ascomycète *E. lata in vitro* (Ferreira et *al*., 1991) et sur des disques de bois (Schmidt et *al*., 2001). Cette bactérie peut également induire des malformations chez les hyphes de ce pathogène (Ferreira et *al*., 1991). Une fois appliquée sur plaies de taille, *B.*

subtilis est capable de réduire voire supprimer l'incidence de l'eutypiose (Ferreira et *al*., 1991 ; Kotze et *al*., 2011).

Dans le même contexte, l'UMR Santé et Agroécologie du Vignoble développe une stratégie de lutte biologique contre l'esca, via l'utilisation de bactéries bénéfiques endophytes naturellement présentes dans le bois des ceps de vigne de la région de Bordeaux (Haidar et *al*., 2016) et en Tunisie (Rezgui et *al*., 2016). Une première étude récente menée par Haidar et *al*. (2016) a montré la capacité des souches bactériennes à agir directement sur la protection de la vigne en réduisant le pourcentage de nécrose sur boutures de vignes cv. Cabernet Sauvignon dû au phytopathogène *N. parvum*. Une deuxième étude menée par Rezgui et *al*. (2016) a montré la capacité d'une souche de *B. subtilis* à réduire les nécroses dues aux deux agents pathogènes, *P. chlamydospora* et *N. parvum*, impliqués dans les MDBs sur deux cépages, le Cabernet Sauvignon et le Muscat d'Italie. Ces derniers résultats sont détaillés dans le chapitre 3 de ce mémoire de thèse.

D'autres micro-organismes bactériens aux propriétés antagonistes, *i.e. Pseudomonas fluorescens*, *Pantoea agglomerans* et *Erwinia herbicola*, ont également été testés (Tableau 4) *in planta* sur le cépage Chardonnay (Compant et *al*., 2013). *E. herbicola* exerçait une activité antifongique contre *E. lata in vitro* et sur disques de bois (Schmidt et *al*., 2001) via la sécrétion des sidérophores et de molécules antifongiques comme l'herbicoline ou la pyrrolydine.

Tableau 4. Exemple des bactéries antagonistes contre les maladies du bois de la vigne

Bactérie antagoniste	Mode d'action	Phytopathogène	Maladie	Application	Références
B.subtilis	Antibiose	*Eutypa lata*	Eutypiose	*In planta*	Ferreira et *al*., 1991
B.subtilis	Antibiose	*Eutypa lata*	Eutypiose	Disque du bois	Schmidt et *al*., 2001
B.subtilis	Antibiose	*Lasidioplodia theobromae*	Dépérissement de vigne	*In vitro*	Alfonzo et *al*., 2009
B.subtilis AG1	Antibiose	*Phaemoniella chlamydospora*	Esca	*In vitro*	Alfonzo et *al*., 2009
B.subtilis AG1	Antibiose	*Phaeoacremonium aleophilum*	Esca	*In vitro*	Alfonzo et *al*., 2009
B. subtilis B6	Antibiose	*Neofussicoccum parvum*	Esca	*In vitro* *In planta*	Rezgui et *al*., 2016
B. subtilis B6	Antibiose	*Lasidoploidia pseudotheobromaea*	Esca	*In vitro*	Rezgui et *al*., 2016
B. subtilis B6	Antibiose	*Schizophyllum commune*	Esca	*In vitro*	Rezgui et *al*., 2016
B. subtilis B6	_	*Phaemoniella chlamydospora*	Esca	*In planta*	Rezgui et *al*., 2016
Pantoea agglomerans S5	_	*Neofussicoccum parvum*	Esca	*In planta*	Rezgui et *al*., 2016
Pantoea agglomerans S5	_	*Phaemoniella chlamydospora*	Esca	*In planta*	Rezgui et *al*., 2016
Erwinia herbicola	Antibiose	*Eutypa lata*	Eutypiose	Disque du bois	Schmidt et *al*., 2001

Objectifs

Les maladies du bois de la vigne mettent en danger la pérennité de la plupart des vignobles en France, ce qui inquiète fortement la profession vitivinicole. En Tunisie, ces maladies sont relativement peu connues, mais elles sont présentes et elles semblent en pleine expansion. Dans ces deux pays, aucun moyen de lutte chimique efficace n'est actuellement homologué. Il est aussi nécessaire de mentionner que le souhait sociétal et politique de réduire fortement les traitements phytosanitaires chimiques fait que ce type de produit n'est pas une solution d'avenir. La mise au point de démarches innovantes pour une protection durable du vignoble est donc actuellement une priorité en recherche (Thiéry et *al*., 2007). Le biocontrôle constitue une voie de recherche prometteuse et en expansion pour lutter contre les pathologies de la vigne, dont les maladies du bois. Ce dernier point fait l'objet de la présente thèse.

Les objectifs développés dans ce manuscrit visent à :

(i) déterminer quels agents pathogènes sont responsables des dégradations du bois de la vigne en Tunisie ? Les symptômes correspondent-ils à ceux de l'esca, la MDB la plus fréquente en Europe ? Existe-t-il une spécificité des agents pathogènes chez les ceps tunisiens ?

(ii) Caractériser les communautés bactériennes colonisant la vigne et isoler des bactéries potentiellement bénéfiques. Ces micro-organismes naturellement présents sur les ceps présentent l'avantage d'être écologiquement adaptés à la vigne. Il a été choisi d'étudier les bactéries colonisant les parties ligneuses de ceps matures (>10 ans) sélectionnés en Tunisie.

(iii) Identifier et caractériser les bactéries isolées des ceps tunisiens par séquençage, tests biochimiques, tests d'antagonismes et de protection de plants de deux cépages, un qui est très fréquent en Tunisie, le Muscat d'Italie, et l'autre qui l'est en France, le Cabernet Sauvignon. A l'issue de cette thèse, des bactéries candidates au biocontrôle devraient être disponibles.

Matériels et méthodes

1. Matériel végétal et échantillonnage

1.1 Au vignoble Tunisien

Différents vignobles du Nord de la Tunisie, dont les caractéristiques sont présentées dans le Tableau 5, ont été prospectés pendant l'été 2013 pour la présence de symptômes foliaires d'une maladie du bois de la vigne, l'esca. Tous les vignobles visités étaient couverts de filets anti-grêle, équipés de systèmes d'irrigation goutte à goutte (Fig. 16B) et avec des ceps palissés en pergola haute (Fig. 16C). Seuls les ceps ayant exprimé des symptômes foliaires ont été considérés ; ils appartenaient tous à un seul cultivar, le Muscat d'Italie. Ces plants constituaient un essai préliminaire pour l'isolement de souches fongiques impliquées dans l'esca, et de souches bactériennes bénéfiques ayant un effet antagoniste contre les pathogènes responsables de cette pathologie.

Figure 16. Sites d'échantillonnage (A). Mode de conduite en pergola haute (B), Filet anti- grêle (C).

Afin d'isoler des espèces fongiques colonisant les tissus ligneux, la prospection et l'échantillonnage ont été réalisés dans deux vignobles de la région de Borj El Amri (Gouvernorat de la Manouba), deux vignobles de la région de Cité El Mehrine (Gouvernorat de la Manouba), deux vignobles de la région de Medjez El Bab (Gouvernorat de Béja) et quatre vignobles de la région de Mornag (Gouvernorat de Ben Arous).

Pour l'isolement des bactéries, la prospection a été effectuée dans quatre parcelles du nord tunisien : un vignoble dans la région de Borj El Amri, un vignoble dans la région de Medjez El Bab et deux vignobles dans la région de Mornag (Fig. 16A).

Pour chaque cep ayant présenté des symptômes foliaires d'esca, les bras ont été prélevés et coupés longitudinalement afin de pouvoir étudier la microflore bactérienne et fongique colonisant les différents types de tissus ligneux: bois sains, nécrosés et extrémités des bras. Pour chaque tissus, 2 types d'échantillons ont été prélevés : des bûchettes d'environ 5 mm de long destinées aux études de microbiologie classique, et des languettes d'environ 10 cm de long qui ont été conservés à -20°C en vue d'extractions d'ADN ultérieures.

Tableau 5. Caractéristiques des différents vignobles prospectés

Régions	Vignobles	Cultivars	Age des cultivars en 2013	Porte-greffe	Surface/cv Nombre de ceps/cv	Incidence des MDBs
Mornag	Mornag	Muscat d'Italie Red globe	15 ans	P1103 Rud géré 140	2 hectares/cv 2500 ceps/cv	6% 0%
	Sidi Sâad	Muscat d'Italie	10 ans	P1103	3 hectares/cv 4500 ceps/cv	0.33%
	Kheledia	Muscat d'Italie Rich-Baba Sam	17 ans	P1103 Ru140	1 hectare/cv 1200 ceps/cv	1.66% 0%
	Zawiyet Mornag	Muscat d'Italie Red Globe	15 ans	P1103 Rud géré 140	5 hectares/cv 6000 ceps/cv	3% 0%
Medjez El Bab	V1	Muscat d'Italie Red globe	14 ans	P1103 Rud géré 140	1 hectare/cv 1275 ceps/cv	0% 0%
	V2	Muscat d'Italie Victoria Rich-Baba Sam	13 ans	P1103 P1103 Ru140	2 hectares 1 hectare 1 hectare 1700 ceps/cv	0.06% 0% 0%
Cité El Mehrine	V3	Muscat d'Italie Red globe	12 ans	P1103 Rud géré 140	1 hectare/cv 1275 ceps/cv	0% 0%
	V4	Muscat d'Italie Rich baba sam	14 ans	P1103 Ru140	0.5 hectare/cv 637 ceps/cv	0% 0%
Borj El Amri	V5	Muscat d'Italie Red globe Victoria	15 ans	P1103 Rud géré 140 P1103	2 hectares/cv 2550 ceps/cv	0.03% 0% 0%
	V6	Muscat d'Italie Red globe	13 ans	P1103 Rud géré 140	1 hectare/cv 1275 ceps/cv	0.3% 0%

Légende : cv : cultivar.

1.2 En conditions contrôlées

Trois essais séparés ont été réalisés durant cette thèse: (i) deux essais de protection *in planta* sur 780 boutures foliées enracinées de vignes cv. Cabernet Sauvignon (390 boutures en 2014) et cv. Muscat d'Italie (390 boutures en 2015). Treize traitements contenant chacun 30 boutures ont été testés pour chaque cultivar (cf. 4.2.3) ; (ii) un essai de pathogenicité *in planta* sur 225 boutures

foliées enracinées de vignes cv. Muscat d'Italie avec neuf traitements contenant chacun 25 boutures (cf. 4.1).

Les plantes ont été cultivées sous serre en conditions contrôlées à l'UMR 1065 SAVE, Bordeaux Aquitaine, France: la température de l'air (22°C<T<28°C) et l'humidité relative (HR 66%) étaient mesurées à l'aide d'un sonde Vaisala HMP 35C (Campbell Sci., Logan, UT). Les jeunes plants âgés d'un mois ont été rempotés en pots individuels dans un mélange de terre franche, de terreau et de tourbe deux mois avant les essais entrepris.

2. Étude des communautés microbiennes par Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

2.1 Extraction de l'ADN

Les extractions d'ADN ont été réalisées à l'aide d'un kit commercial, l'Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitek). Avant extraction, les tissus prélevés ont été broyés dans de l'azote liquide à l'aide d'un broyeur à bille TissueLyser II (Qiagen). Environ 60 mg de biomasse ont été placés dans un tube Eppendorf contenant 400 µl de tampon de lyse P additionnés de 20 µl de protéinase K et incubés par la suite à 65°C pendant 30 min avant d'être transférés sur des colonnes filtrantes puis centrifugés 1 min à 11 000 rpm. Pour supprimer les ARN de l'échantillon, 40 µl de RNase A ont été ajoutés au filtrat (10 mg/ml), homogénéisés brièvement au vortex avant d'être incubés pendant 5 min à température ambiante. Par la suite, 200 µl de tampon de fixation P ont été ajoutés au filtrat et vortexés avant d'être transférés sur une nouvelle colonne filtrante. Après avoir été incubés pendant 1 min à température ambiante, les tubes ont été centrifugés 1 min à 11 000 rpm. Les membranes filtrantes sur lesquelles sont fixés les ADN ont ensuite été transférées dans un nouveau tube collecteur avant de subir une première étape de lavage par l'ajout de 550 µl de tampon de lavage I suivi d'une centrifugation pendant 1 min à 11 000 rpm. Une deuxième étape de lavage a été réalisée en additionnant au culot 550 µl de tampon de lavage II suivi d'une centrifugation d'1 min à 11 000 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 4 min à 11 000 rpm. Les membranes ont ensuite été transférées dans un nouveau tube collecteur, auquel 50 µl de tampon d'élution D préalablement chauffé à 65°C ont été ajoutés et les tubes ont été centrifugés pendant 1 min à 11000 rpm après les avoir incubés pendant 3 min à température ambiante. Finalement, les ADN ont été élués puis dosés au nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer, Thermoscientific, Labtech) avant d'être stockés à -20°C pour une utilisation ultérieure.

2.2 Analyses SSCP

Les différents jeux d'amorces utilisés pour étudier les populations bactériennes et fongiques sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6. Amorces utilisées pour amplifier les ADN fongique et bactérien

	Gène	Nom amorces	Séquence 5'3'	Taille amplicon	T°C annealing
Champignons	**mt LSU rDNA**	ML1* (1)	**6-FAM** TACTTTTGCATAATGGGTCAGC	253 bp	58°C
		ML2* (1)	**6-FAM** TATGTTTCGTAGAAAACCAGC		
Bactéries	**16S rDNA**	799f (2)	AACMGGATTAGATACCCKG	≈ 350 bp	54°C
		1115r* (2)	**6-FAM** AGGGTTGCGCTCGTTG		

Légende: Amorces marquées en 6-FAM (6-carboxyfluorescéine), (1) White et *al*., 1990,(2) Redford et *al*., 2010.

Les réactions d'amplification par PCR ont été effectuées dans un thermocycleur Mastercycler Gradient (Eppendorf) dans un volume réactionnel de 25 µl contenant 2 µl d'ADN (10 ng/µl), 2.5 µl de tampon Pfu (10x) (Stratagene), 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 (Stratagene) et 15.5 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 ($1.6x10^{-6}$ 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 ADN 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'élongation (1 min à 72°C) et d'une élongation 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'élongation (1 min à 72°C) et d'une élongation finale de 10 min à 72°C.

Après vérification sur gel d'agarose, les produits d'amplification ont été préparés pour l'analyse SSCP: 1 µl de produit PCR a été mélangé à 18.8µl de formamide déionisé (Applied Biosystem) et 0.2µl 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 réappariemment.

Les brins d'ADN ainsi obtenus ont alors été séparés par électrophorèse capillaire et détectés grâce au marquage des amorces (6-FAM).

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 : 15kV et 32°C pendant 2000 secondes. Les profils SSCP ainsi obtenus ont ensuite été alignés sous StatFingerprints, puis analysés en Analyse en Composantes Principales à l'aide du logiciel R (2.11.1, Rcmdr Package). Les résultats obtenus ont été ensuite traités statistiquement à l'aide du Test ANOSIM (Vegan R-Package) en utilisant la matrice de distance de Bray-Curtis.

3. Isolement et caractérisation des micro-organismes colonisant les tissus Ligneux de la vigne

3.1 Isolement et purification

L'isolement des bactéries et des champignons à partir des différents tissus de la vigne suppose une désinfection de surface qui a été réalisée par trempage des bûchettes :

- 1 min dans de l'éthanol (70%) puis 3 min dans de l'hypochlorite de calcium (CaClO 2.5%) suivis de trois rinçages à l'eau distillée stérile pour les bactéries. Trois dépôts de 100 µl chacun de la troisième eau de rinçage ont été étalés sur du milieu R2A afin de vérifier l'efficacité de la désinfection.

- 30 secondes dans de l'hypochlorite de calcium (CaClO 2.5%) suivi par un rinçage à l'eau distillée stérile pour les champignons.

Quinze bûchettes ont ensuite été déposées sur 3 boîtes de Petri (5 bûchettes / boîte) contenant du milieu R2A additionné de 100 mg/l de cycloheximide (anti-eucaryote) et incubées à 27°C pour les bactéries ; ou du milieu Malt Agar (MA) additionné de 100 mg/l de chloramphénicol (antibactérien) et incubées à 25°C pendant minimum 3 semaines, pour les champignons.

Les souches bactériennes et fongiques ainsi obtenues, ont ensuite été isolées, purifiées et conservées pour des analyses ultérieures:

- sur milieu R2A, avant d'être fixées sur des cryobilles stockées à -20°C (Protect Bacterial Preservers, Technical Service Consultant Limited, Dutscher) pour les bactéries.

- sur milieu Malt Agar, avant d'être stockées en double exemplaire à 4°C, dans des piluliers sur gélose inclinée et dans du glycérol 50% à -20°C pour les champignons.

3.2 Identification moléculaire par séquençage

3.2.1 Extraction d'ADN des souches pures

Les extractions d'ADN ont été réalisées à partir de culots bactériens obtenus par centrifugation à 3700 rpm pendant 30 min de cultures en milieu liquide TSB (Tryptone Soja Broth) âgées de 48 h ; et de mycéliums fongique prélevés à la surface du milieu de culture par grattage, lyophilisés pendant une nuit, et broyés à l'aide d'un Tissue Lyser II (Qiagen).

Quatre cent µl de tampon d'extraction CTAB (1X) ont alors été ajoutés. Les tubes ont ensuite été incubés à 65°C pendant 1 heure. Après homogénéisation des échantillons, 400 µl de Chloroforme Isoamylalcool ont été ajoutés et les tubes agités par retournement avant d'être centrifugés 10 min à 13 000 rpm. Un volume V de la phase aqueuse a été récupéré et 2/3 V d'isopropanol froid ont été ajoutés. Après avoir été mélangés par retournement, les tubes ont été laissés à 20°C pendant une nuit. Après une centrifugation de 10 min à 13 000 rpm, le surnageant a été éliminé et les culots d'ADN lavés dans 700 µl d'éthanol froid. Après une nouvelle centrifugation de 10 min à 13 000 rpm, le surnageant a été éliminé et les échantillons placés dans un Speed Vac (Jouan) pendant 20 minutes afin d'éliminer les dernières traces d'éthanol. Pour finir, l'ADN bactérien et fongique a été respectivement resuspendu dans 50 µl et 100 µl d'eau distillée stérile.

Les ADN ainsi extraits ont ensuite été dosés pour chaque échantillon à l'aide d'un nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer, Thermoscientific, Labtech) et stockés à -20°C avant leur utilisation.

3.2.2 Amplification et séquençage

L'amplification des ADN bactériens et fongiques a été effectuée en utilisant respectivement les amorces universelles 799f (AACMGGATTAGATACCCKG)/ 1429r (GTTACCTTGTTACGACTT) et rpoBf (GACGATCATYTWGGAAACCG) / rpoBr (GGNGTYTCRATYGGACACAT) ; et ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') / ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et *al*., 1990).

Les réactions d'amplification par PCR ont été effectuées dans un volume réactionnel de 30 µl contenant 2 µl d'ADN (20 ng/µl) pour les bactéries et 50ng/µl pour les champignons, 3 µl de tampon (10x), 1 µl de $MgCl_2$ (50mM), 0.6 µl de dNTP (10 mM), 0.6 µl de chaque amorce (20 µM), 3 µl de BSA (10 µg/µl, BioLabs), 0.1 µl de Taq polymérase (SilverStar DNA polymerase, Eurogentec) et 19.1 µl d'eau distillée stérile.

Pour les bactéries les deux programmes suivant ont été utilisés :

- une dénaturation initiale de 2 minutes à 94°C suivie de 25 cycles de dénaturation à 94°C pendant 45 secondes, de fixation des amorces à 54°C pendant 30 secondes et d'élongation à 72°C pendant 1 minute ; et une élongation finale de 10 min à 72°C pour le jeu d'amorces 799f/1429r.

- une dénaturation initiale de 4 minutes à 94°C suivie de 30 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, de fixation des amorces à 55°C pendant 45 secondes, d'élongation à 72°C pendant 1 minute, et une élongation finale de 10 min à 72°C pour le jeu d'amorces rpoBr/rpoBf.

Pour les ADN fongiques le programme a consisté en une dénaturation initiale de 3 minutes à 95°C suivie de 35 cycles de dénaturation (15 sec à 98°C), d'hybridation des amorces (60 sec à 59°C), d'élongation (2 min à 72°C); et d'une élongation finale de 10 minutes à 72°C.

Après vérification sur gel d'agarose (2% - 120V – 30 min de migration), les produits d'amplification ont été envoyés pour le séquençage chez Beckman Coulter Genomics (Takeley, Royaume Uni). Chaque séquence obtenue a été comparée à la base de données nucléotidiques du NCBI grâce au BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), et en fonction du pourcentage d'identité (>97% pour les champignons et >99% pour les bactéries), les noms d'espèces ont été assignés.

3.3 Caractérisation physiologique, biochimique, moléculaire et métabolique des bactéries et champignons isolés de la vigne

3.3.1 Les champignons endophytes

3.3.1.1 Caractérisation physiologique, effet de la température sur la croissance mycélienne

L'effet de la température sur la croissance mycélienne des trois champignons sélectionnés, *i.e. Lasidiodiplodia pseudotheobromae, Neofusicoccum parvum* et *Schizophyllum commune,* a été évalué en plaçant un disque de mycélium fongique provenant d'une culture fraîche âgée de 5 jours au centre d'une boite de Petri contenant du milieu MA. Pour chaque souche fongique, 8 températures allant de 5°C à 40°C avec des intervalles de 5°C ont été testées. Quatorze répétitions pour chaque phytopathogène ont été réalisées. La croissance mycélienne de chaque isolat a été mesurée en mm à des intervalles de temps réguliers : 24, 48, 72 et 96 heures (Valtaud et *al*., 2009 ;Ismail et *al*., 2012).

3.3.1.2 Compétition *in vitro* entre les trois phytopathogènes *Lasidiodiplodia pseudotheobromae, Neofusicoccum parvum* et *Schizophyllum commune*

Dans des boîtes de Petri contenant du milieu malt agar, deux explants de 6 mm de diamètre provenant de cultures fongiques âgées de 5 jours ont été placés à 40 mm l'un de l'autre. Toutes les combinaisons entre les trois souches fongiques ont été testées. Sept traitements contenant chacun 14 répétitions ont donc été réalisés pour tester la compétition *in vitro* entre les 3 phytopathogènes : (i) *N.P*: *N. parvum* seul, (ii) *L.P*: *L. pseudotheobromae* seul, (iii) *S.C*: *S. commune* seul, (iv) *N.P+L.P: N. parvum* avec *L. pseudotheobromae,* (v) *N.P+S.C*: *N. parvum* avec *S. commune,* (vi) *L.P+S.C*: *L. pseudotheobromae* avec *S. commune* et (vii) *N.P+L.P+S.C*: triple combinaison de *N. parvum, L. pseudotheobromae* et *S. commune.* L'ensemble des boîtes de Petri a ensuite été incubé à 25°C et/ou 30°C (la température optimale des souches fongiques) à l'obscurité pendant 72h.

La compétition entre les trois pathogènes a été évaluée en fonction du pourcentage de colonisation (C) de chaque champignon de l'espace séparant les explants d'une même boîte à l'aide du rapport suivant (Camporota, 1985): **C= (DT*100)/DE** [DT est la distance parcourue, sur l'axe reliant 2 explants, par le front de la colonie fongique au bout de 72 h et DE, la distance séparant les explants].

3.3.2 Les bactéries endophytes

3.3.2.1 Caractérisation biochimique

Les souches pures bactériennes cultivables obtenues ont été caractérisées par 3 tests biochimiques:

Test à la potasse (solution aqueuse à 3 % de KOH), afin de différencier les bactéries gram positives et gram négatives. Ce test est réalisé en émulsionnant une colonie bactérienne dans une goutte de réactif. Si la suspension présente un caractère visqueux et filant, il s'agit de bactéries Gram^{-}, et si la suspension ne file pas, il s'agit de bactéries Gram $^{+}$.

Test catalase : il s'agit ici de déterminer si la souche bactérienne testée possède l'enzyme catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée 3%, Sigma), la catalase. Si la souche bactérienne testée possède une catalase, lorsqu'elle est déposée dans une goutte de peroxyde d'hydrogène, on observera la formation de bulles d'oxygène par la réaction suivante : $H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O$.

Test oxydase : il est réalisé avec des disques pré-imprégnés d'oxalate de N-diméthyl-paraphénylène diamine et d'α-naphtol (Sigma). En présence de l'enzyme cytochrome oxydase

(bactéries Gram$^-$), ces deux composés réagissent en formant du bleu d'indophénol et le disque se colore en violet là où la colonie bactérienne a été déposée.

3.3.2.2 Détection des gènes codant pour deux familles d'antibiotiques

Les bactéries ont été testées pour la production de lipopeptides antifongiques appartenant à la famille des fengycines et de l'iturine en utilisant des amorces spécifiques (Lin et *al*., 1998 ; Ramarathnam et *al*., 2007 ; Alvarez et *al*., 2011): 4 gènes codant pour 4 fengycine (A, B, D et E) et 1 gène codant pour la bacillomycine (iturine) ont été recherchés (Tableau 7).

Les réactions d'amplification par PCR ont été effectuées dans un volume réactionnel de 30 µl contenant 2 µl d'ADN (20 ng/µl), 3 µl de tampon (10x), 1 µl de $MgCl_2$ (50mM), 0.6 µl de dNTP (10 mM), 0.6 µl de chaque amorce (20 µM) (Tableau 7), 3 µl de BSA (10 µg/µl, BioLabs), 0.1 µl de Taq polymérase (SilverStar DNA polymerase, Eurogentec) et 19.1 µl d'eau distillée stérile.

Pour les fengycines, le programme suivant a été utilisé: une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes suivie de 45 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1 minute, d'hybridation des amorces à 53°C/54°C (Tableau 7) pendant 1 minute et d'élongation à 72°C pendant 2 minutes 30 secondes; et une élongation finale à 72°C pendant 8 minutes.

Tableau 7. Amorces spécifiques pour la recherche des gènes codants aux fengycines A B, D et E et la bacillomycine chez les bactéries endophytes isolées des ceps Tunisiens

Gène	Nom de l'amorce	Séquence 5'3'	Taille de la bande (bp)	T°C d'hybridation
Fengycine	FENAf	GACAGTGCTGCCTGATGAAA	900 bp	54°C
	FENAr	GTCGGTGCATGAAATGTACG		
	FENBf	ATCCATGGTTAAAAACCAAAAT	950 bp	54°C
	FENBr	ACGGATCCATGCTATTTGGCAGC		
	FENDf	TTTGGCAGCAGGAGAAGTTT	950 bp	53°C
	FENDr	GCTGTCCGTTCTGCTTTTTC		
	FENEf	GCCAAAAAGAAACGAGCAG	950 bp	53°C
	FENEr	GTCGGAGCTAACGCTGAAAC		
Bacillomycine	BACCf	GAAGGACACGGCAGAGAGT	900 bp	60°C
	BACCr	CGCTGATGACTGTTCATGC		

Pour la bacillomycine le programme a consisté en une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes suivie de 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1 minute, d'hybridation des amorces à 60°C pendant 30 secondes et d'élongation à 72°C pendant 1 minute 45 secondes ; et une élongation finale à 72°C pendant 8 minutes.

La présence ou l'absence de bandes a ensuite été vérifiée sur gel d'agarose (2% - 120V – 30 min de migration).

3.3.2.3 Caractérisation métabolique par des plaques Biolog EcoPlate™

Une caractérisation métabolique des souches bactériennes isolées à partir des ceps Tunisiens, a été effectuée à l'aide de microplaques Biolog EcoPlate™ (AWEL International). Ces plaques permettent de vérifier simultanément la réaction métabolique des bactéries en regard de 31 substrats lyophilisés et d'un témoin négatif présents en triplicat sur chaque plaque: 10 substrats contiennent du carbone et de l'azote (dont 6 amino-acides), 2 contiennent du carbone et du phosphore, et 19 ne contiennent que du carbone. Un volume de 150 µl de suspension bactérienne (colonies resuspendues dans de l'eau physiologique 0.8%) a été ensemencé dans chaque puits, puis les microplaques ont été incubées à 27°C et à l'obscurité. Des lectures de densité optique (DO) à 590 nm ont été réalisées après 24 heures, 48 heures et 5 jours d'incubation à l'aide d'un lecteur de microplaques (Multimo de Synergy HT, Bio-Tek). Chaque puits contient en plus du substrat, des sels de tétrazolium qui virent au violet lorsqu'ils sont réduits par l'activité bactérienne. C'est l'absorbance de ces sels de tétrazolium qui sera mesurée lors de la lecture DO des plaques donnant ainsi une estimation de la dégradation des substrats par les bactéries.

Les mesures de DO obtenues ont permis de calculer l'AWCD (Average Well Color Development) qui représente l'activité métabolique moyenne des bactéries cultivables selon la formule suivante : AWCD=$\Sigma(DOpuit - DOinitiale)/31$.

Les données calculées ont ensuite été analysés en Analyse en Composantes Principales à l'aide du package Rcmdr (2.2-3) du logiciel R (3.2.2).

3.3.2.4 Étude des facteurs pour la promotion de croissance des plantes

3.3.2.4.1 Détection de la production de sidérophores

La production de sidérophores a été testée en cultivant les bactéries sur milieu gélosé chromazurol S (CAS) [2.5% bouillon nutritif (NB, Conda), 1.5% agar, 0.1 M piperazin-1,4-bisethanesulfonic acid (PIPES), 10 µM Chrome Azurol S (Sigma) et 0.2 mM hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA, Sigma)] décrit par Schwyn et Neilands (1987), et qui est basé sur l'affinité des sidérophores pour le fer. Le complexe ternaire \ chromazurol-fer-HDTMA (hexadecyltrimethylammonium bromide) sert d'indicateur coloré en passant du bleu à l'orange en présence d'un chélate plus fort, qui le débarrassera de son fer. Ce test permet une visualisation très rapide des micro-organismes producteurs de sidérophores, un halo de décoloration apparaissant autour des colonies.

L'inoculation des bactéries a été effectuée par piqûre centrale des géloses en boîte de Petri. Les expérimentations ont été réalisées en triplicat. La production de sidérophores a ensuite été mesurée

en mm après une semaine d'incubation à 27°C, en fonction de la taille des halos (ds) formés autour des colonies bactériennes. Les souches testées ont été notées sid^{+}, sid^{++} et sid^{+++} respectivement lorsque 0 mm <ds≤5 mm, 5 <ds≤10 mm et ds> 10 mm.

3.3.2.4.2 Solubilisation du phosphate

Le test de solubilisation du phosphate a été effectué sur milieu gélosé de Pikovskaya [(NH2)2SO4, 0.5g/l; extrait de levure, 0.5g/l; phosphate bicalcique, 5g/l; KCl, 0.2g/l; MgSO4, 7H2O, 0.1g/l; glucose, 10g/l; Agar, 15g/l; MnSO4, 0.0001g/l et FeSO4, 0.0001g/l ; pH 7] (Pikovskaya, 1948). Des pastilles bactériennes (5mm) issues de pré-cultures fraîches sur milieu R2A ont été placées au centre des boîtes de Petri et incubées à 27°C. Pour chaque souche testée, 8 boîtes ont été ensemencées. La zone de solubilisation a été mesurée en mm après 10 à 15 jours d'incubation en soustrayant le diamètre de la colonie bactérienne du diamètre total du halo (dp). Les souches ont été notées $phos^{+}$, $phos^{++}$ et $phos^{+++}$ respectivement lorsque 5 mm <dp≤15 mm, 15 mm <dp≤30 et dp> 30 mm.

3.3.2.5 Caractérisation biologique : test d'hypersensibilité sur tabac

Le test d'hypersensibilité sur le tabac sert à mettre en évidence le pouvoir pathogène d'une souche bactérienne suite au dessèchement de la zone d'inoculation sur feuille de tabac. Il consiste à injecter 1 ml d'une suspension bactérienne (10^8 bactéries/ml) d'une culture jeune (24 h) dans l'espace intercellulaire le long de la nervure centrale ou de la nervure secondaire de la face inférieure d'une jeune feuille de tabac variété White Burley (stade 5 à 6 feuilles) à l'aide d'une seringue stérile.

Chaque souche bactérienne a été inoculée sur 3 feuilles séparées. Des feuilles ont été inoculées par de l'eau distillée stérile pour servir de témoins négatifs. Le test est considéré positif s'il apparaît au bout de 24 h à 48 h, une plage nécrotique au niveau de la zone inoculée.

3.3.2.6 Test de confrontations *in vitro* entre les bactéries endophytes et les trois pathogènes fongiques *L. pseudotheobromae, N. parvum* et *S. commune* isolés de ceps tunisiens

Une strie de culture bactérienne âgée de 48h a été placée au centre d'une boîte de Petri contenant du milieu PDA (Potato Dextrose Agar). Deux disques du pathogène de 5 mm de diamètre (culture de 7 jours) ont été placés à 2.5 cm de part et d'autre de la strie bactérienne à tester. Les boîtes ont

ensuite été incubées à 25°C pendant 5 jours. Le pourcentage d'inhibition du mycélium des pathogènes fongiques testés a été calculé selon la formule :

I (%) = 100 x [(R2 – R1)/R1] avec R1: le rayon le plus long du mycélium fongique en direction de l'antagoniste (valeur témoin) ; R2 : la distance relative à la croissance du mycélium fongique (mm) en absence de l'antagoniste (Whipps, 1987).

4. Essais réalisés *in planta*

4.1 Test de pathogénicité de *L. pseudotheobromae, N. parvum* et *S. commune* sur des boutures cv. Muscat d'Italie

La capacité de *L. pseudotheobromae*, *N. parvum* et *S. commune* à produire des nécroses internes et des chancres externes, a été testée par inoculation artificielle au niveau de la tige de boutures de vigne cv. Muscat d'Italie dans des conditions contrôlées sous serre (cf 1.2).

Neuf traitements contenant chacun 25 boutures ont été testés: i) C: témoin négatif non inoculé, ii) CP: témoin négatif percé et inoculé avec un disque stérile de malt agar, iii) NP : témoin positif inoculé avec *N. parvum*, iv) LP : témoin positif inoculé avec *L. pseudotheobromae*, v) SC : témoin positif inoculé avec *S. commune*, vi) NP+LP : plantes co-inoculées avec *N. parvum* et *L. pseudotheobromae*, vii) NP+SC : plantes co-inoculées avec *N. parvum* et *S. commune*, viii) LP+SC : plantes co-inoculées avec *L. pseudotheobromae* et *S. commune*, et ix) NP +LP +SC : plantes co-inoculées avec les trois pathogènes *N. parvum*, *L. pseudotheobromae* et *S. commune*.

Les inoculations ont été réalisées en juin 2015. Les boutures cv. Muscat d'Italie ont été inoculées par insertion d'un disque de mycélium (3-4 mm de diamètre) dans un trou en dessous du premier œillet de la tige percée artificiellement à l'aide d'une perceuse mécanique. La zone percée et inoculée a ensuite été enveloppée dans du parafilm pour la protéger de contaminations ultérieures. Quatre mois après l'inoculation (octobre 2015), les boutures ont été coupées longitudinalement pour observer et mesurer le pourcentage de nécrose ([taille de nécrose/taille de sarment]*100) (Fig. 17).

Afin de vérifier le postulat de Koch, 5 copeaux de bois ont été échantillonnés à partir de deux zones différentes : A = partie nécrosée du bois et B = bois sain. Ainsi, 450 copeaux de bois (10 bûchettes*5 boutures*9 modalités) ont été prélevés et déposés après désinfection sur du milieu malt agar pendant 7 jours à 25°C (Fig. 17). Pour les boutures témoins négatifs, *i.e.* C et CP, les 10 bûchettes ont été collectées uniquement dans la zone B (pas de nécroses observées).

L'ADN génomique des 58 souches fongiques pathogènes ré-isolées a été extrait et envoyé à séquencer selon le protocole décrit précédemment (cf 3.2).

Les résultats ont été traités statistiquement à l'aide du logiciel R version 3.2.2. Dans un premier temps, les données recueillies ont été analysées pour savoir si elles suivaient une loi normale. Pour ce faire, le test de Levene a été utilisé. Les données ne suivant pas la loi normale, le test non paramétrique de Kruskal-Wallis ou le test t-student ont été finalement utilisées.

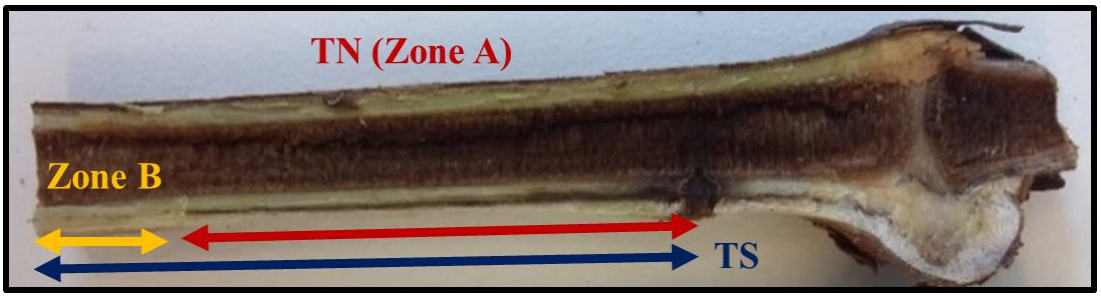

Figure 17. Calcul du pourcentage de nécroses internes = [taille de nécrose « TN »/taille de sarment « TS »]*100 ; et les deux zones de prélèvements des bûchettes pour la vérification du postulat de Koch.

4.2 Test de protection *in planta*

4.2.1 Les agents pathogènes fongiques

Deux pathogènes, *i.e. Phaeomoniella chlamydospora* et *Neofusicoccum parvum* ont été utilisés pour l'ensemble des expérimentations menées dans le cadre de cette étude.

La souche *P. chlamydospora* SO37 utilisée fait partie de la collection de l'UMR 1065 SAVE (INRA Bordeaux Aquitaine, France) et a été choisie pour sa virulence et sa capacité à induire des nécroses dans le bois (Laveau et *al*., 2009). Cette souche a été repiquée sur milieu malt agar et incubée pendant 7 semaines à 25°C tout en respectant la photopériode pour favoriser la sporulation du pathogène. La souche *N. parvum* utilisée et celle qui a été isolée dans le cadre de cette thèse en 2014 à partir de ceps de vignes tunisiens cv. Muscat d'Italie de la région de Mornag (cf Résultats-chapitre1). Ce pathogène a été repiqué sur milieu malt agar et incubé pendant 7 jours à 22°C (12 heures de lumière / 12 heures d'obscurité) avant l'inoculation artificielle sous serre des boutures des deux cultivars de vigne.

4.2.2 Les bactéries antagonistes

Deux souches bactériennes, l'une d'origine française, *i.e. Pantoea agglomerans* S5, isolée de tissus nécrotique de bois de vigne français (cv. Cabernet Sauvignon) (Bruez et *al*., 2015 ; Haidar et *al*., 2016), et l'autre d'origine tunisienne, *i.e. Bacillus subtilis* B6, isolée de tissus nécrotique de bois de vigne tunisien (cv. Muscat d'Italie) (Rezgui et *al*., 2016) ont été utilisées dans cette étude.

Le choix pour S5 s'est basé sur des études antérieures montrant l'efficacité de cette souche contre *Botrytis cinerea* et *N. parvum* sur vigne lors d'essais *in planta* (Haidar et *al*., 2016). Tandis que le choix de B6 s'est basé sur son effet à réduire la croissance mycélienne du pathogène *N. parvum in vitro* par le biais des tests de confrontations réalisés dans cette thèse (cf Résultats, chapitre 2).

Les bactéries ont été cultivées à l'obscurité dans des flacons de culture stériles contenant 40 ml de milieu TSB pendant 48 h à 30°C avant leur inoculation en serre. La croissance bactérienne a été déterminée en comparant la turbidité bactérienne avec une solution standard de McFarland (bioMérieux® SA) et la concentration a été estimée entre 10^8 et 10^9 UFC / ml (échelle 4, McFarland).

4.2.3 Inoculation des boutures de vigne sous serre

Deux essais de protection indépendants ont été réalisés sur des plants de vigne de deux cultivars : français, le Cabernet Sauvignon (raisin de cuve) en été 2014 et tunisien, le Muscat d'Italie (raisin de table, variété la plus répandue en Tunisie) en été 2015.

Chaque essai comportait au total 390 boutures réparties en 13 modalités différentes avec 30 plants par condition. Ces modalités étaient réparties comme suit : (i) témoin négatif non inoculé ni par les bactéries ni par les champignons ; (ii) témoin percé inoculé par le milieu bactérien stérile TSB et un disque fongique stérile de MA; (iii) témoin positif inoculé par les pathogènes fongiques *N. parvum* ou (iv) *P. chlamydospora* ; (v) plants inoculées seulement par les souches antagonistes B6 ou (vi) S5 ou (vii) la combinaison des 2 bactéries ; (viii) plants co-inoculés par *N. parvum* et B6 ou (ix) *N. parvum* et S5 ou (x) *N. parvum* et la combinaison B6+S5 ; (xi) plants co-inoculés par le *P. chlamydospora* et B6 ou (xii) *P. chlamydospora* et S5 ou (xiii) *P. chlamydospora* et la combinaison B6+S5.

Un trou a été percé artificiellement dans la tige en dessous du premier œillet à l'aide d'une perceuse mécanique. 40 µl de suspension bactérienne ajustée à 10^8 CFU /ml ont été injectés dans le trou. 10 à 20 minutes après, un disque fongique prélevé à partir d'une culture fraîche bien sporulée d'un des deux pathogènes a été placé sur le site de blessure à l'aide d'un scalpel stérile. La zone percée et inoculée a été ensuite enveloppée avec du parafilm pour la protéger de la dessiccation et de contaminations ultérieures (Fig. 18A).

Quatre mois après l'inoculation (octobre 2015, pour cv. Cabernet Sauvignon et Octobre 2016, pour cv. Muscat d'Italie), les boutures ont été coupées longitudinalement pour observer et mesurer le pourcentage de nécrose ([taille de nécrose/taille de sarment]*100) (Fig. 17, Fig. 18B). Des

prélèvements de tissus (languettes de bois d'environ 10 cm) ont également été effectués pour les deux cultivars afin d'analyser la microflore fongique et bactérienne globale par la technique SSCP (cf. 2). Un total de 39 échantillons (3 pools composés des tissus prélevés sur 3 boutures de chaque modalité x 13 modalités) a ainsi été obtenu pour chaque cépage.

Figure 18. Etapes de la co-inoculation des boutures de vigne par des bactéries antagonistes et des pathogènes fongiques (A) et mesure des nécroses internes (B). Perçage de la bouture (A1), inoculation par 40 µl de suspension bactérienne (A2), inoculation par un disque fongique de l'un des deux champignons (A3, 4), protection de la zone d'inoculation par du parafilm (A5).

Résultats et discussions

Chapitre 1

Caractérisation d'agents pathogènes du bois des ceps de vigne dans le Nord de la Tunisie

Awatef Rezgui, Jessica Vallance, Asma Ben Ghnaya-Chakroun, Emilie Bruez, Mokthar Dridi, Najla Sadfi-Zouaoui and Patrice Rey. "Three pathogenic fungi associated with Grapevine Trunk Diseases in Tunisia". Cette publication est soumise à la revue *Phytopathologia Mediterranea* fin Novembre.

1. Introduction

Les maladies du bois de la vigne (MDBs) sont parmi les maladies les plus anciennes mais aussi les plus complexes décrites sur la vigne lorsqu'on considère l'existence de l'ensemble des pathogènes associés à ces pathologies (Armengol et *al*., 2001). Un cortège de champignons est impliqué dans les MDBs, appartenant entre autre à la famille des Botryosphaeriaceae, responsable de chancres, de dépérissements et de la pourriture des fruits de la vigne, mais également d'autres plantes ligneuses (Johnson et *al*., 1991, 1993; Ramos et *al*., 1991; Brown-Rytlewski et McManus, 2000; Smith et *al*., 2001; Damm et *al*., 2007; Amponsah et *al*., 2011; Thomidis et *al*., 2011; Ni et *al*., 2012; Bruez et *al*., 2014). Dans la famille des Botryosphaeriaceae, de nombreuses espèces sont liées aux MDBs, telles que *Lasiodiplodia theobromae* qui induit la mort et le dépérissement d'environ 500 plantes hôtes dont la vigne (El-Goorani et El Meleigi, 1972; Bester et *al*., 2007; Ismail et *al*., 2012; Tovar Pedraza et *al*., 2013; Che et *al*., 2015); et *Botryosphaeria parva* (*Neofusicoccum parvum*) qui est l'un des champignons les plus virulents associés aux MDBs (van Niekerk et *al*., 2004; Laveau et *al*., 2009; Úrbez-Torres et Gubler, 2009). Plusieurs autres espèces fongiques ont également été associées aux MDBs: trois champignons basidiomycètes, *Fomitiporia punctata* (Crous et Gams, 2000; Armengol et *al*., 2001), *Fomitiporia mediterranea* (Mugnai et *al*., 1999; Giovani et Sparapano, 2006) et *Stereum hirsutum* (Crous et Gams, 2000); et deux ascomycètes, *Phaeoacremonium aleophilum* et *Phaeomoniella chlamydospora* (Larignon et Dubos, 1997; Mugnai et *al*., 1999; Sparapano et *al*., 2000, 2001).

2. Objectifs

La connaissance des micro-organismes endophytes colonisant les ceps de vigne atteints par les maladies du bois de la vigne, en particulier l'esca, est actuellement peu élucidée (Gerbore, 2009). L'objectif de ce chapitre a été d'isoler des champignons pathogènes impliqués dans les MDBs en Tunisie et de vérifier leur pathogenicité. La première partie de ce travail a été consacrée à (i) l'étude des symptômes de la forme lente et de la forme apoplectique de cette maladie dans le nord de la Tunisie, *i.e.* sites de Mornag, Medjez El Bab, Cité El Mehrine et Borj El Amri, et (ii) à l'isolement des espèces fongiques endophytes impliqués dans l'esca. La deuxième partie a été réservée à l'identification du complexe de pathogènes fongiques colonisant le bois nécrosé de ceps de vigne du cépage Muscat d'Italie par des approches microbiologiques, biologiques et moléculaires. Dans une troisième partie, la pathogénicité de trois espèces fongiques isolées et connues comme étant impliquées dans les MDBs, *i.e. Lasidiodiplodia pseudotheobromae*,

Neofusicoccum parvum et *Schizophyllum commune*, a été testée *in planta* sur des boutures de cv. Muscat d'Italie.

3. Résultats

3.1 Etat sanitaire des parcelles de vigne : prospection et échantillonnage

Dix vignobles ont été visités dans le nord de la Tunisie en été 2013 pour l'évaluation des attaques par les MDBs, principalement l'esca, dans cette région. Le taux des ceps malades était variable dans les quatre régions prospectées à savoir la région de Mornag (quatre vignobles), la région de Medjez El Bab (deux vignobles), Borj El Amri (deux vignobles) et cité El Mehrine (deux vignobles). Ce taux montre une différence au sein de la même région : il était de 0.33 % dans le vignoble de Sidi Sâad, 1.66% dans le vignoble de Khelidia, 3 % dans le vignoble de Zawiyet Mornag pour atteindre 6% dans le vignoble Mornag de la région de Mornag. Ce taux était inférieur à 0.1 % pour le reste des ceps visités (Tableau 5).

L'identification de la maladie de l'esca a été effectuée par l'étude des symptômes de chaque cep. Seuls les cultivars Muscat d'Italie de la région de Mornag et Borj El Amri présentaient des symptômes foliaires d'esca. Par la suite, les ceps recueillis dans ces deux régions, ont été analysés au laboratoire selon la procédure décrite dans la partie Matériel et Méthodes.

Dans la région de Mornag, les symptômes typiques de la forme apoplectique d'esca caractérisée par un dessèchement rapide et total entrainant la mort du cep ont été observés (Fig. 19A). Sur d'autres ceps, l'existence de marbrures au niveau des feuilles caractéristiques de la forme lente l'esca (Fig. 19B) mais également de nécroses centrales de couleur brun foncé au niveau de la coupe transversale du bois (Fig. 19C), a été constatée.

Au niveau de la région de Medjez El Bab, aucun symptôme typique des MDBs n'a été trouvé dans le Vignoble n°1 et seul un pied atteint par le Black Dead Arm (BDA) a été remarqué dans le Vignoble n°2. Dans la région Cité El Mehrine, aucun pied malade n'a été recensé. Pour la région de Borj El Amri, les mêmes symptômes d'esca qui ont été auparavant observés dans la région de Mornag, ont été remarqués dans les Vignobles n°5 et 6 (Tableau 5).

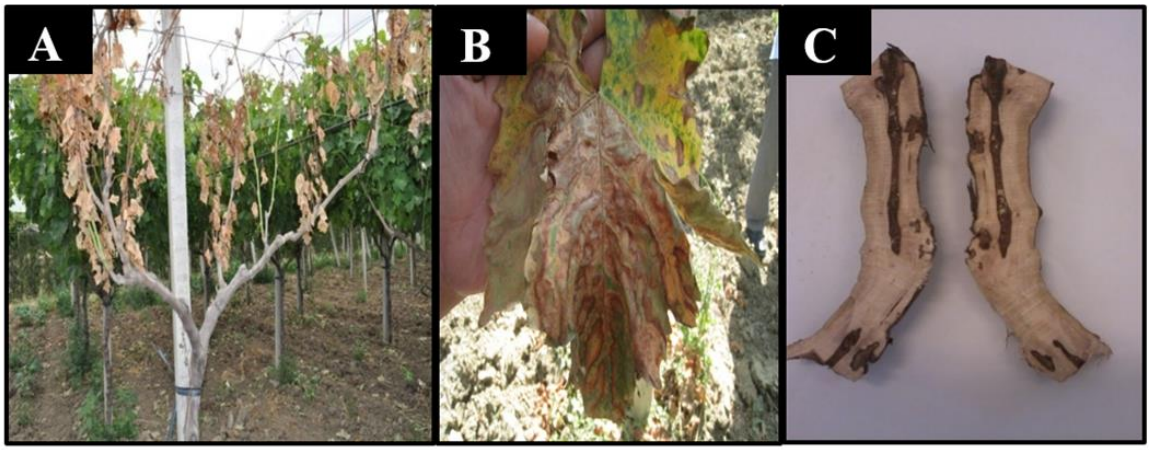

Figure 19. Les différents symptômes de la maladie de l'esca observés dans la région de Mornag : Forme apoplectique (A). Symptômes caractéristiques sur feuilles (B). Nécrose centrale brune caractéristique de l'esca (C).

3.2 Isolement de *Lasidiodiplodia pseudotheobromae, Neofusicoccum parvum* et *Schizophyllum commune* dans le Nord de la Tunisie

Dans cet essai, cinquante-huit souches fongiques ont été isolées à partir des 75 bûchettes de bois déposées sur le milieu MA : 16 souches à partir des tissus nécrotiques, 26 à partir des tissus non-nécrotiques et 16 souches à partir des extrémités des bras. Leur identification taxonomique a été basée sur des caractéristiques morphologiques.

Seules les 16 souches fongiques isolées à partir des tissus nécrosés font l'intérêt de cette étude (Tableau 8). Leur séquençage a montré que parmi les isolats trouvés, 3 genres sont impliqués selon la littérature dans les maladies du bois de la vigne, *i.e. Neofusicoccum parvum* (1 souche), *Lasidiodiplodia pseudotheobromae* (1 souche) et *Schizophyllum commune* (2 souches). Ces souches ont été isolées uniquement à partir des prélèvements effectués sur les ceps provenant de la région de Mornag tandis que pour la région de Borj El Amri, seuls des saprophytes ont été retrouvés.

3.3 Aspect macroscopique des trois souches fongiques impliquées dans l'esca, *i.e. Neofusicoccum parvum, Lasidiodiplodia pseudotheobromae* et *Schizophyllum commune*

Les souches isolées sont de différents aspects et couleurs et ont des vitesses de croissance différentes. L'observation macroscopique a été effectuée après incubation de ces 3 souches fongiques pendant 3 et 7 jours à 25°C sur milieu MA. La souche *N. parvum* (Fig. 20A. 1) est de couleur blanche, croît rapidement et forme un mycélium dense qui devient vert foncé. La couleur

du revers est au début vert olive puis devient gris foncé (Fig. 20A. 2). Les colonies de *L. pseudotheobromae* (Fig. 20B. 1) croissent rapidement, sont initialement blanches puis deviennent noir foncé (Fig. 20B. 2). Les colonies de *S. commune* (Fig. 20 C. 1, 2) ont une croissance lente, sont blanches cotonneuses avec un revers jaune.

Tableau 8. Origine et identification moléculaire des souches fongiques endophytes isolées à partir des tissus nécrotiques

Souches	Site d'échantillonnage	Identification moléculaire (ITS)
F15	Borj El Amri	*Alternaria tenuissima* (JN542519.1, 100%)
F17	Borj El Amri	*Alternaria alternata* (FJ228163.1, 99%)
F33	Borj El Amri	*Alternaria tenuissima* (JN542519.1, 100%)
F34	Borj El Amri	*Alternaria. Alternata* (KC692221.1, 99%)
F35	Borj El Amri	*Alternaria alternata* (AY154682.1, 100%)
F36	Borj El Amri	*Alternaria alternata* (FJ228163.1, 99%)
F39	Borj El Amri	*Acremonium strictum* (EU497953.1, 99%)
F41	Mornag	***Schizophyllum commune*** **(**KJ093499.1, 99%)
F42	Mornag	***Schizophyllum commune*** **(**FJ478109.1, 99%)
F46	Mornag	*Fusariumlateritium* (GU480949.1, 99%)
F47	Mornag	***Lasidiodiplodia pseudotheobromae*** **(**GQ469969.1, 100%)
F48	Mornag	***Neofusicoccum parvum*** (JQ647911, 99%)
F50	Mornag	*Alternaria mali* (AY154683.1, 100%)
F51	Mornag	*Acremonium strictum* (EU497953.1, 99%)
F53	Mornag	*Acremonium strictum* (EU497953.1, 99%)
F58	Mornag	*Alternaria tenuissima* (KP942908.1, 99%)

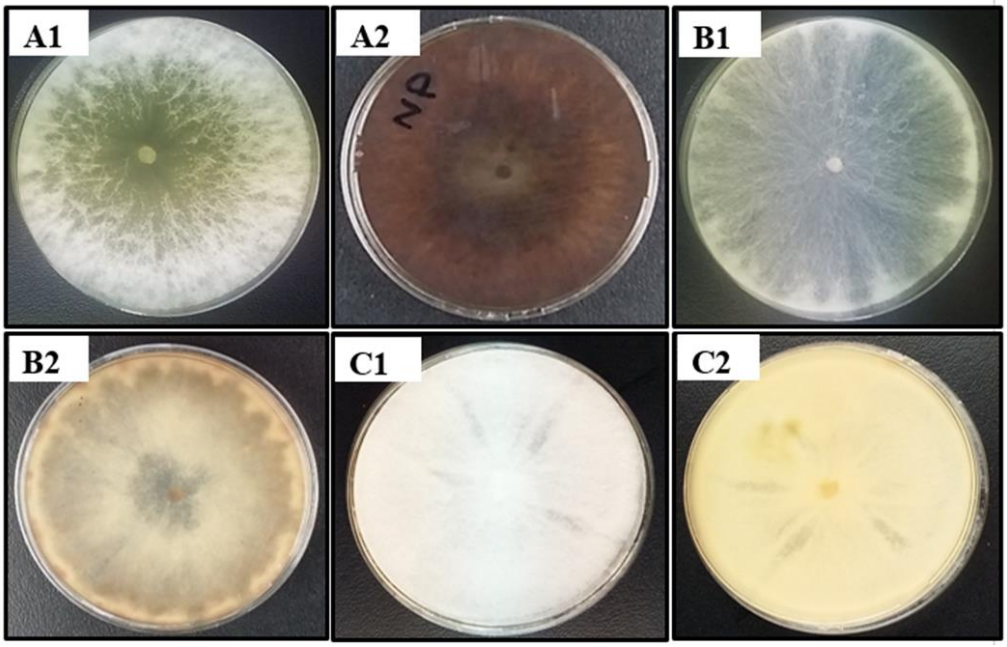

Figure 20. Aspect macroscopique de trois champignons, *i.e. N. parvum* (A), *L. pseudotheobromae* (B) et *S. commune* (C), impliqués dans les maladies du bois de la vigne après 3 (A1, B1, C1) et 7 jours d'incubation (A2, B2, C2) à l'obscurité à 25°C sur milieu MA.

3.4 Effet de la température et de la durée d'incubation sur la croissance radiale des trois pathogènes fongiques isolés

Les résultats obtenus montrent que pour les 3 champignons étudiés, la croissance mycélienne est affectée par la température et la durée d'incubation (Fig. 21).

Pour chaque durée d'incubation testée, la température optimale de croissance était de 25°C pour *N. parvum* (39.5 mm) et de 30°C pour *L. pseudotheobromae* (39.5 mm) et *S. commune* (15.6 mm). Les températures de 5°C et 40°C ont inhibé la croissance mycélienne exceptée pour *S. commune* qui pouvait pousser à 40°C. Celui-ci a d'ailleurs eu une croissance plus limitée dans toutes les conditions testées, comparée à celles de *N. parvum* et *L. pseudotheobromae* pour qui les diamètres mycéliens mesurés étaient au minimum trois fois supérieurs. Il faut également noter que les souches fongiques *N. parvum* et *L. pseudotheobromae* ont présenté une croissance radiale plus rapide que *S. commune*. Celles-ci ont atteint leur croissance maximale après 3 jours d'incubation tandis que *S. commune* a atteint la sienne après 4 jours.

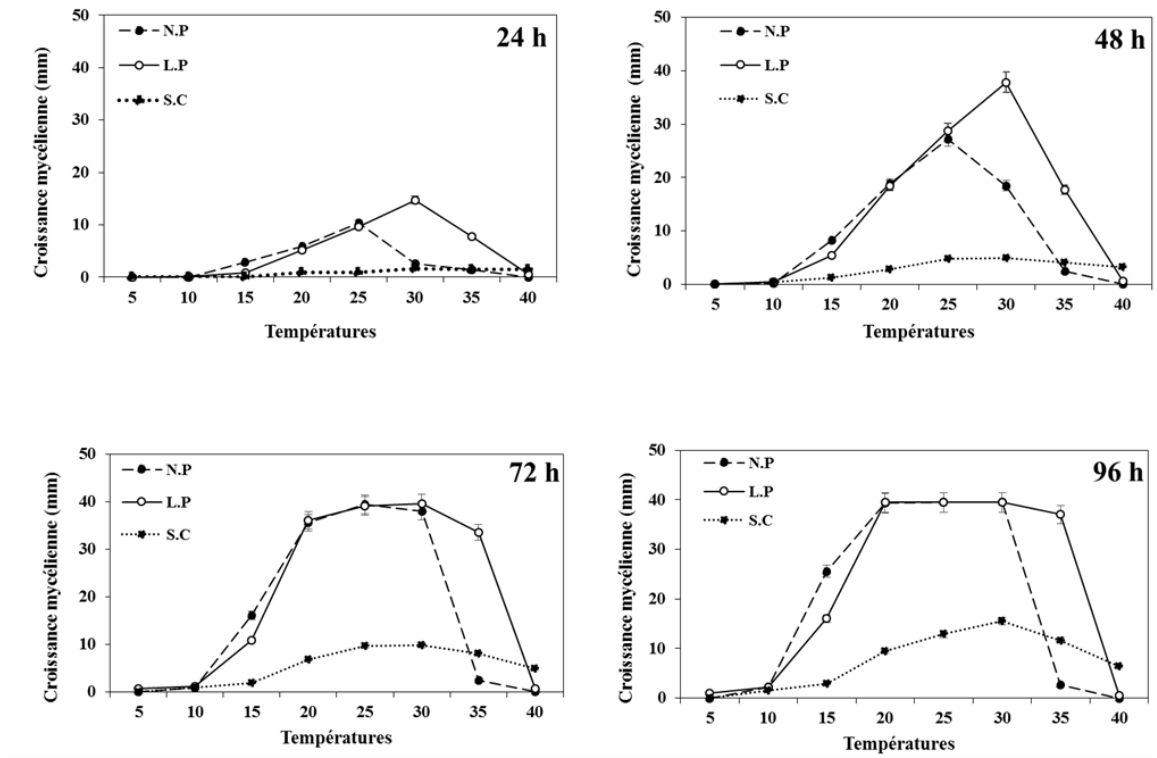

Figure 21. Croissance mycélienne (en mm) des 3 champignons *N. parvum* (N.P), *L. pseudotheobromae* (L.P) et *S. commune* (S.C) incubés à différentes températures après 24, 48, 72 et 96 heures.

3.5 Test d'antagonisme *in vitro* entre les trois pathogènes fongiques isolés

Les résultats de la confrontation directe entre les 3 souches fongiques sont présentés sur la figure 22. Les résultats obtenus montrent que la croissance mycélienne de la souche *N. parvum* (Fig. 22A) est significativement différente (P <0.05) de celle en présence de *L. pseudotheobromae* et *S. commune* en double et en triple combinaisons après 72 h d'incubation à 25°C et/ou 30°C. *L. pseudotheobromae* enregistre la plus forte réduction de la croissance mycélienne de *N. parvum* (60%) suivie de *S. commune* (20%), tandis que la combinaison des deux souches n'accroit pas ce phénomène (P>0.05).

Pour la souche *L. pseudotheobromae* (Fig. 22B), sa croissance a été significativement réduite (P <0,05) en présence de *N. parvum* (42%) et de *S. commune* (22%) à 30°C. À 25°C, la croissance du champignon a été affectée en présence de *N. parvum* en double (42%) et en triple combinaison (46%); tandis qu'en présence de *S. commune* une réduction de croissance a été enregistrée seulement en triple combinaison (22%).

Pour *S. commune*, les résultats obtenus (Fig. 22C) ont montré que *L. pseudotheobromae* a un effet inhibiteur sur la croissance mycélienne en double (13,6%, 17,1%) et en triple (19,7%, 13,7%) combinaison, respectivement à 25°C et 30°C. *N. parvum* a inhibé la croissance de *S. commune* dans les essais de triple combinaison à 25°C et 30°C (P <0,05), tandis qu'aucune réduction de la croissance mycélienne n'a été enregistrée (P <0,05) en double combinaison pour les deux températures étudiées.

3.6 Mise en évidence des nécroses induites chez la vigne suite à l'attaque artificielle par *N. parvum, L. pseudotheobromae* et *S. commune* et vérification du Postulat de Koch

La taille des nécroses générées par *N. parvum* (N.P), *L. pseudotheobromae* (L.P) et *S. commune* (S.C) dans le tronc des boutures de Muscat d'Italie a été mesurée afin d'évaluer leur pouvoir pathogène. La figure 23 montre les résultats des taux de nécrose obtenus en fonction des différents traitements. La taille des lésions dépend significativement de l'inoculum utilisé (P<0.05). Les dégâts les plus importants ont été obtenus avec *N. parvum* qui a provoqué des taux de nécrose de l'ordre de 80%. Les taux d'attaque obtenus avec *L. pseudotheobromae* et *S. commune* étaient 2 à 2,5 fois inférieurs avec respectivement des pourcentages de nécrose de 32 et 35%. Il est à noter également que le mélange des 3 pathogènes semble avoir un effet réducteur sur le pourcentage d'attaque de *N. parvum*.

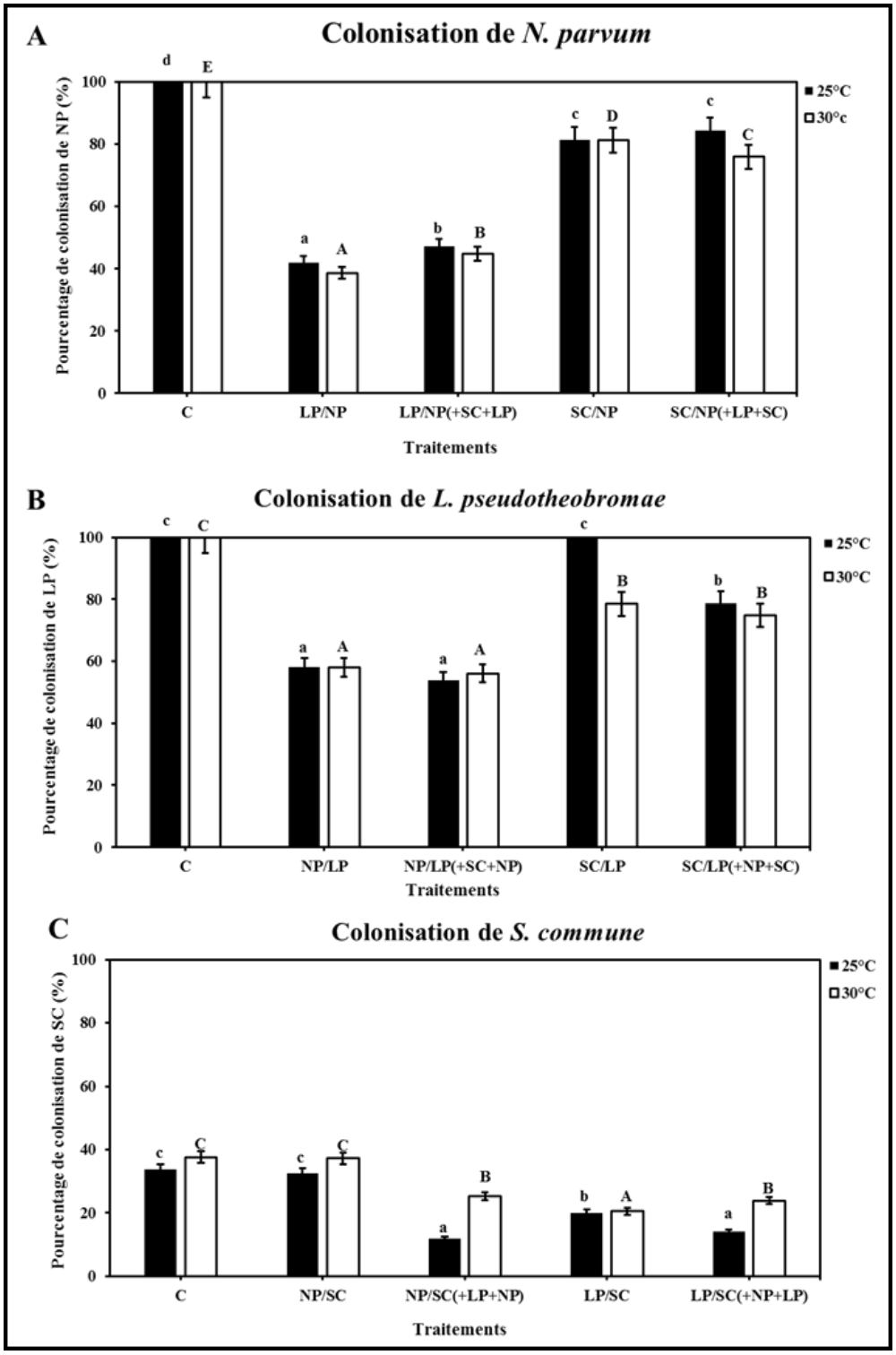

Figure 22. Intensité de colonisation en pourcentage de *N. parvum* (A), *L. pseudotheobromae* (B) et *S. commune* (C) en double et triple combinaison après 72h d'incubation.

Légende : C : Témoin souche pure, LP/NP : effet de LP sur NP en double combinaison, SC/NP : effet de SC sur NP en double combinaison, LP/NP (+SC+LP) : effet de LP sur NP en triple combinaison, SC/NP(LP+SC): effet de SC sur NP en triple combinaison, NP/LP : effet de NP sur LP en double combinaison, SC/LP: effet de SC sur LP en double combinaison, NP/LP (+SC+NP): effet de NP sur LP en triple combinaison, SC/LP (NP+SC): effet de SC sur LP en triple combinaison, NP/SC: effet de NP sur SC en double combinaison, LP/SC: effet de LP sur SC en double combinaison, NP/SC (LP+NP): effet de NP sur SC en triple combinaison et LP/SC (+NP+LP): effet de LP sur SC en triple combinaison. Les histogrammes présentant la même lettre majuscule ou minuscule ne diffèrent pas significativement entre eux, $P > 0.05$ par le test de Kruskal-Wallis.

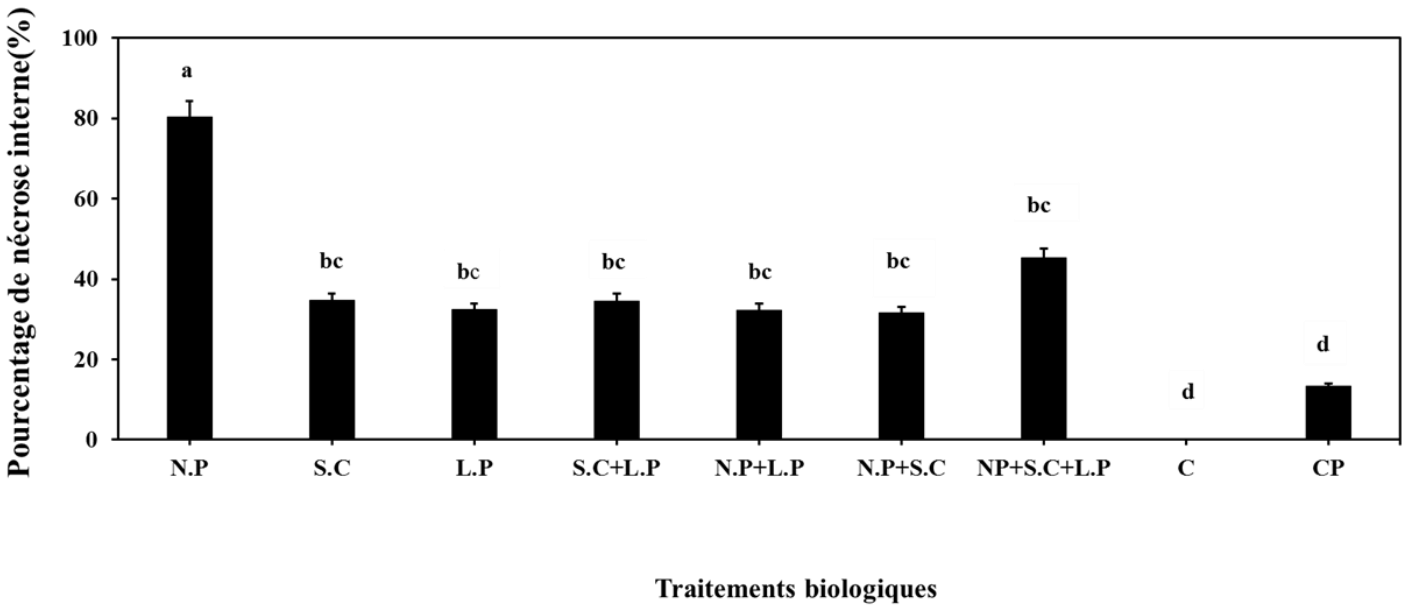

Figure 23. Pourcentages de nécrose interne induits par *N. parvum* (N.P), *L. pseudotheobromae* (L.P) et *S. commune* (S.C) sur le cultivar Muscat d'Italie. Les barres d'histogramme dont les lettres diffèrent sont statistiquement différentes selon le test de Kruskall-Wallis ($P<0.05$).

Légende : C : contrôle négatif, CP : contrôle négatif percé.

En effet, seul, ce dernier induit un pourcentage de nécrose de 80% tandis qu'en présence de *L. pseudotheobromae* le pourcentage de nécrose est de 32%, de 35% en présence de *S. commune* et de 45% en présence des deux (*S.C+LP*). *N. parvum* n'a en revanche eu aucun effet sur la taille des nécroses induites par *L. pseudotheobromae* et *S. commune.*

Un total de 145 souches fongiques a été ré-isolé à partir des 450 bûchettes prélevées dans les 9 traitements testés : 87 champignons saprophytes, 29 souches de *N. parvum*, 13 souches de *L. pseudotheobromae* et 16 souches de *S. commune* (soit un total de 58 souches pathogènes) (Tableau 9). Il est à noter que les souches des 3 champignons pathogènes n'ont été ré-isolées que de la zone A «nécrosée», tandis que seulement des souches saprophytes, *i.e. Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. …, ont été isolés de la zone B (tissu non nécrosé) (Tableau 9). Une caractérisation moléculaire basée sur le séquençage des ITS des 58 souches pathogènes ré-isolées confirme qu'il s'agit du même matériel que celui qui avait été inoculé au début de l'expérience.

Pour les boutures témoins négatifs « C et CP » seuls des champignons saprophytes ont été isolés.

Tableau 9. Champignons pathogènes isolés de la zone A « tissus nécrosés » et B « tissus non nécrosés » à partir des 9 traitements entrepris

Traitements	Zone A				Zone B			
	N.P	***L.P***	***S.C***	**Saprophytes**	***N.P***	***L.P***	***S.C***	**Saprophytes**
N.P	25	0	0	0	0	0	0	4
L.P	0	10	0	2	0	0	0	7
S.C	0	0	4	1	0	0	0	1
N.P+L.P	1	1	0	5	0	0	0	3
N.P+S.C	3	0	3	3	0	0	0	1
L.P+S.C	0	2	5	3	0	0	0	3
N.P+L.P+S.C	0	0	4	4	0	0	0	4
C	-	-	-	-	0	0	0	23
CP	-	-	-	-	0	0	0	23
Total	29	13	16	18	0	0	0	69

Légende : *L.P : Lasidiodiplodia pseudotheobromae, N.P : Neofusicoccum parvum, S.C : Schizophyllum commune.*

4. Discussion

L'objectif de cette étude a été d'apporter des éléments nouveaux sur les maladies du bois de la vigne en Tunisie, en particulier l'esca, et d'identifier les espèces fongiques pathogènes associées aux ceps ayant présenté des symptômes externes caractéristiques de MDBs.

Lors de la prospection réalisée dans 10 vignobles tunisiens pour la production de raisin de table, sur les 4 cultivars, *i.e.* Muscat d'Italie, Victoria, Rich Baba Sam et Red Globe, seuls des ceps cv. Muscat d'Italie ont montré des symptômes foliaires typiques de l'esca. Selon les parcelles, le taux de ceps atteints variait de 0.03 à 6%. Les pourcentages les plus élevés ont été observés dans la région de Mornag, suggérant ainsi que les MDBs pourraient dans le futur affecter sérieusement la longévité des vignobles de cette région. Dans les autres régions prospectées, les 3 autres cultivars ne semblaient pas affectés par les MDBs.

Ce résultat est en accord avec Bruez et *al*. (2013) qui ont rapporté des différences significatives entre différentes variétés lors d'un suivi épidémiologique effectué en France. Ces auteurs ont également montré qu'une variété donnée pouvait exprimer différents niveaux de maladies en fonction des régions dans lesquelles elle était plantée. C'est ce qui est observé dans cette étude puisque le niveau d'incidence de MDBs diffère entre la région de Mornag, où les symptômes sont les plus fréquents, et les 3 autres.

Les maladies de dépérissement de la vigne ont été principalement observées sur des ceps de vigne destinés à la production de vin (Bruez et *al*., 2013; Haidar et *al*., 2016; Yacoub et *al*., 2016). Des études ont cependant montré que les cultivars destinés pour la production de raisin de table pouvaient également être atteints, *e.g.* Red globe (Auger et *al*., 2004; Mutawila et *al*., 2011; Morales et *al*., 2012) et Victoria (Mutawila et *al*., 2011) au Chili et en Afrique du Sud. Concernant les variétés Muscat d'Italie et Rich Baba Sam, il n'existe à notre connaissance, aucune information sur leur sensibilité aux MDBs. Dans cette étude, les 3 cultivars Red globe, Rich Baba Sam et Victoria semblaient indemnes de MDBs. Les hypothèses permettant d'expliquer ce résultat peuvent être : (i) les conditions climatiques spécifiques d'une région viticole, (ii) l'absence d'inoculum fongique, (iii) la faible agressivité des souches fongiques au sein des ceps concernés.

Trois espèces fongiques connues pour être impliquées dans les MDBs, *i.e. Lasidiodiplodia pseudotheobromae*, *Neofusicoccum parvum* et *Schizophyllum commune* (Armengol et *al*., 2001, Fisher, 2002), ont été isolées des tissus nécrosés de ceps cv. Muscat d'Italie et leur identité a été confirmée par le séquençage de la région ITS (White et *al*., 1990; Chanderbali et *al*., 2001).

L. pseudotheobromae appartient à la famille des Botryosphaeriaceae et fait partie des espèces fongiques associées aux dépérissements de plusieurs plantes, *i.e.* maïs (Diab et *al*., 1984), agrumes

(Abo-El-Dahab et *al*., 1992), betterave (Abd-ElGhani et Fatouh, 2005), mangue (Abdalla et *al*.,2003, Ismail et *al*., 2012) ainsi qu'à la vigne à l'échelle mondiale (El-Goorani et El Meleigi, 1972 ; Yan et *al*., 2013 ; Dissanayake et *al*., 2015). Cette espèce est connue comme étant un pathogène des régions tropicales et subtropicales (Burgess et *al*., 2003), ce qui explique probablement sa présence dans les vignobles tunisiens caractérisés par un climat relativement chaud, de type méditerranéen.

N. parvum est l'une des espèces fongiques les plus virulentes impliquée dans les MDBs (Laveau et *al*., 2009 ; Úrbez-Torres et Gubler, 2009) ; elle induit des nécroses internes et externes (chancre) sur les parties ligneuses de la vigne (Phillips, 2002 ; Laveau et *al*., 2009 ; Amponsah et *al*., 2011). Cette espèce pathogène a été isolée dans les cinq continents (Baskarathevan et *al*., 2011 ; Yan et *al*., 2011a, b; 2012, 2013 ; Larignon et *al*., 2001, 2009, 2015; Kuntzmann et *al*., 2010 ; Bruez et *al*., 2013). Son caractère ubiquiste suggère donc sa capacité d'adaptation à différentes conditions climatiques, y compris le climat méditerranéen Tunisien.

S. commune est également considéré comme étant impliqué dans les MDBs (Úrbez-Torres et *al*., 2012). Ce phytopathogène est impliqué dans les dépérissements et la mort d'un large spectre de plantes dont le pistachier (Michailides et *al*., 1995), l'olivier (Úrbez-Torres et *al*., 2013) et le pêcher (Chen et *al*., 2015).

Les résultats obtenus dans cette étude confirment donc ceux obtenus lors de précédents travaux, à savoir que *L. pseudotheobromae, N. parvum* et *S. commune* sont des champignons ubiquistes qui colonisent le bois nécrosé de ceps de vignes matures (âgés de 10 à 17 ans) dans de nombreuses régions viticoles dans le monde, y compris dans le Nord de la Tunisie (principalement dans la région de Mornag). Dans la littérature, plusieurs autres pathogènes fongiques sont répertoriés pour leur implication dans les maladies du bois de la vigne: *Botryosphaeria dothidea, Diatrypella* sp., *Diplodia corticola, D. mutila, D. sarmentorum, D. seriata, Dothiorella americana, E. lata, Lasidiodiplodia. crassispora, L. theobromae, L. viticola, L. missouriana, N. australe, N. luteum, N. macroclavatum, N. mediterraneum, N. ribis, N. viticlavatum, Phaeomoniella chlamydospora , Pestalotiopsis* sp., *Pestalotiopsis vicola, Phomopsis viticola* et *Togninia minima* (Ma et *al.*, 2001; Taylor et *al.*, 2005; Savocchia et *al*., 2007; Úrbez-Torres et *al.*, 2007a, b, 2010a, b, 2012; Úrbez-Torres et Gubler, 2009; Billones et *al*., 2010 ; Benghnaya-Chakroun et *al*., 2014, Chebil et *al*., 2014). Dans notre étude, ils n'ont pas été isolés des ceps de vigne prélevés. Ce résultat peut être lié à plusieurs facteurs : les conditions climatiques qui peuvent différer selon les régions, les pays et le cultivar utilisé, … ce qui influe sur le microbiote colonisant les ceps de vigne.

Donc, pour comprendre la relation entre les conditions climatiques et les souches fongiques isolées des ceps tunisiens, la température à laquelle chaque champignon isolé atteint sa croissance radiale maximale sur milieu synthétique *in vitro* a été étudiée. Celle-ci était de 25°C pour *N. parvum* et 30°C pour *S. commune* (Espinoza et *al*., 2009, Thomidis et *al*., 2011; Teoh et Mat Don, 2015) après 96 h d'incubation. Cet optimum de température pour *N. parvum* s'est montré un peu plus faible que celui trouvé dans des études antérieures où il s'approchait des 30°C (Sánchez et *al*., 2003 ; van Niekerk et *al*., 2004; Úrbez-Torres et *al*., 2006a, 2007a, b). Les raisons de ces variations sont inconnues mais peuvent être due à des différences génétiques entre les isolats étudiés, à des différences géographiques (Baskarathevan et *al*., 2011), et/ou à une possible adaptation de cette espèce de *N. parvum* au climat méditerranéen en Tunisie.

Concernant *L. pseudotheobromae*, aucune étude n'a, à notre connaissance, montré l'effet de la température sur la croissance mycélienne de ce champignon. Dans cet essai, l'optimum de croissance obtenu était de 30°C. La croissance du champignon était cependant réduite à 10, 15 et 40°C comparativement à celle observée à 30°C. De plus, contrairement à *N. parvum* et *S. commune*, une légère croissance a été observée à 5°C.

Ces trois champignons sont capables de croître à des températures relativement élevées (> 30°C), ce qui peut suggérer leur adaptation au climat méditerranéen du nord de la Tunisie, qui est généralement caractérisé par des étés chauds et secs et des hivers doux (Donat et *al*., 2014).

Les espèces de Botryosphaeriaceae, *i.e. L. pseudotheobromae* et *N. parvum*, et de Schizophyllaceae, *i.e. S. commune*, ayant été isolées à partir des mêmes ceps de cv. Muscat d'Italie, il nous semblait intéressant de co-inoculer artificiellement ces souches afin de déterminer leur capacité à infecter les plants de ce cultivar. Ces observations seront une aide précieuse pour développer et optimiser des méthodes de lutte efficaces lors d'essais de protection ultérieurs (cf Chapitre 3).

La pathogénicité de *L. pseudotheobromae, N. parvum* et *S. commune* a été confirmée lorsque ces champignons ont été inoculés seuls ou en association dans le tronc de boutures de vigne cv. Muscat d'Italie. Toutes les combinaisons testées ont provoqué une induction de nécroses internes liées à la colonisation et à la dégradation des tissus ligneux par les pathogènes fongiques. La sévérité de ces symptômes, *i.e.* la longueur de la nécrose sur la tige, était dépendante de l'inoculum utilisé ($P<0.05$) : *N. parvum* a en effet causé les plus longues nécroses. Ce résultat est en accord avec Úrbez-Torres et Gubler (2009) qui ont montré que *L. theobromae, Neofusicoccum luteum, N. parvum,* et *N. australe* étaient plus agressifs que *Diplodia seriata, D. mutila, Dothiorella iberica* et *D. viticola* dans des vignobles en Californie.

Il est également intéressant de noter que lors de cet essai de pathogenicité *in planta*, un effet compétitif entre les trois champignons *L. pseudotheobromae, N. parvum* et *S. commune* a été observé. Il s'est traduit par la réduction des nécroses induites par *N. parvum* lorsque celui-ci était inoculé avec *L. pseudotheobromae* et/ou *S. commune*. Ce résultat peut probablement être lié à un effet de compétition pour les nutriments et/ou à des réactions d'antagonisme afin d'exclure *N. parvum*. De même, Sparapano et *al*. (2000, 2001) ont rapporté l'association compétitive de *Phaeoacremonium aleophilum* et *Phaeomoniella chlamydospora*, et un effet antagoniste marqué de *P. aleophilum* sur *Fomitiporia punctata* lors du processus de colonisation des tissus ligneux.

Les essais de confrontation *in vitro* entre *L. pseudotheobromae, N. parvum* et *S. commune* confirment ce résultat. Un effet antagoniste plus ou moins marqué a été observé en fonction de l'inoculum appliqué ($P<0.05$) et/ou de la température d'incubation ($P<0.05$). Bien que les mécanismes impliqués dans ces différences soient inconnus, ils pourraient être expliqués par la capacité des champignons à produire des composés antifongiques entre eux (Teoh et Mat Don 2015), et l'effet de la température sur leur croissance influencerait aussi leur pouvoir antagoniste.

En conclusion, cette étude a montré que la variété Muscat d'Italie était plus sensible aux MDBs que les autres cultivars, *i.e.* Red Globe, Rich Baba Sam et Victoria, dans les vignobles du Nord de la Tunisie. Trois champignons pathogènes *L. pseudotheobromae, N. parvum* et *S. commune* ont été isolés pour la première fois à partir du bois nécrosé de ceps de cette variété plantée dans la région de Mornag. Ces trois pathogènes reproduisent les symptômes internes typiques de l'esca lorsqu'ils sont inoculés artificiellement dans le tronc de boutures cv. Muscat d'Italie. Ils ont également été systématiquement ré-isolés à partir de la zone nécrosée, tandis que seulement des saprophytes ont été isolés à partir de la zone non nécrosée ou des boutures témoins. La souche de *N. parvum* s'est montrée la plus virulente lorsque la taille des nécroses induites par ces différents champignons a été comparée. Un effet compétitif *in vitro* et *in planta* entre les trois souches fongiques étudiées a également été montré, elle dépendait de l'inoculum appliqué et/ou de la température d'incubation. Il semble donc que les conditions climatiques, ici le climat méditerranéen tunisien, exercent une influence sur la sensibilité des cultivars aux agents pathogènes des MDBs. Ces hypothèses devront être vérifiées lors d'études ultérieures.

Chapitre 2

Étude de la microflore bactérienne bénéfique colonisant le bois des ceps de vigne plantés dans le Nord de la Tunisie

Awatef Rezgui, Asma Ben Ghnaya-Chakroun, Jessica Vallance, Emilie Bruez, Mohammed Rabeh Hajlaoui, Najla Sadfi-Zouaoui and Patrice Rey. Endophytic bacteria with antagonistic traits inhabit the wood tissues of grapevines from Tunisian vineyards. *Biological Control* (2016), 99, 28-37.

1. Introduction

L'esca est l'une des maladies communes aux vignobles des différents pays du monde, elle cause de sérieux dégâts et met en danger la pérennité des vignobles. Ce problème est d'autant plus grave qu'aucune méthode de lutte chimique n'est actuellement disponible depuis l'interdiction de l'arsénite de sodium en 2001. L'objectif de ce chapitre est de développer une méthode de biocontrôle contre les champignons impliqués dans l'esca. En Europe, seuls 14 genres microbiens (champignons, oomycètes et bactéries) sont actuellement inscrits au règlement européen n°1107/2009. La stratégie choisie consiste d'isoler et de caractériser des micro-organismes naturellement présents dans le bois de ceps provenant de vignobles tunisiens afin de les gérer et d'assurer une protection des plants de vigne lors d'essais ultérieurs. Le principal intérêt des micro-organismes indigènes est leur adaptation naturelle à la plante hôte et à son écosystème.

2. Objectifs

Les objectifs de cette partie étaient de :

(i) Caractériser les communautés bactériennes endophytes colonisant le cultivar, Muscat d'Italie, et d'isoler des bactéries potentiellement bénéfiques dans différents types de tissus, *i.e.* bois nécrosé, bois apparemment sain et extrémité des bras. Il a été choisi d'étudier les bactéries colonisant les parties ligneuses de ceps relativement matures (10-17 ans) sélectionnés en Tunisie et atteints d'esca.

(ii) Identifier et caractériser les bactéries isolées pour sélectionner des candidats au biocontrôle par séquençage, tests biochimiques et tests d'antagonisme.

3. Résultats

3.1 Analyse globale des communautés bactériennes colonisant les tissus ligneux des ceps de vigne tunisiens par SSCP

Un total de 30 profils SSCP a été obtenu à partir des échantillons de bois prélevés dans les bras des ceps de vigne tunisiens : 12 bois sains (BS), 12 bois nécrosés (BN) et 6 extrémités de bras (EB). Le nombre de pics ainsi que le décollement de la ligne de base observés sur les profils témoignent de la diversité et de l'abondance des populations bactériennes qui colonisent ces tissus ligneux (Fig. 24).

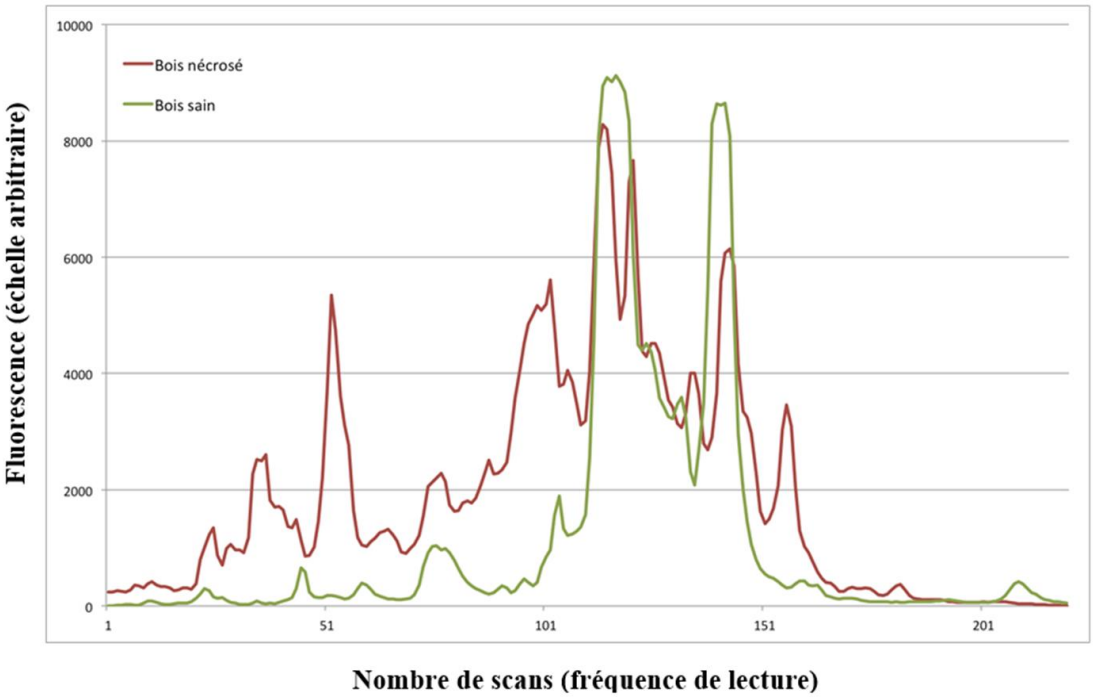

Figure 24. Exemples de profils SSCP obtenus à partir d'échantillons de bois sain et nécrosé prélevés dans le bras de ceps de vigne tunisiens.

La distribution des individus sur le plan principal généré par l'Analyse en Composantes Principales (ACP) est présentée dans la figure 25. Les deux premiers axes, Dim 1 et Dim 2, expliquent 51% de la variabilité bactérienne totale. Le résultat obtenu montre que la structure génétique des populations bactériennes est significativement différente en fonction des types de tissus analysés ($P<0.01$, ANOSIM), *i.e.* bois sains (BS), bois nécrosé (BN) et extrémité des bras (EB). Aucune différence n'a en revanche été montrée entre les populations bactériennes colonisant les ceps des deux régions d'échantillonnage, *i.e.* Mornag et Borj El Amri (non montré).

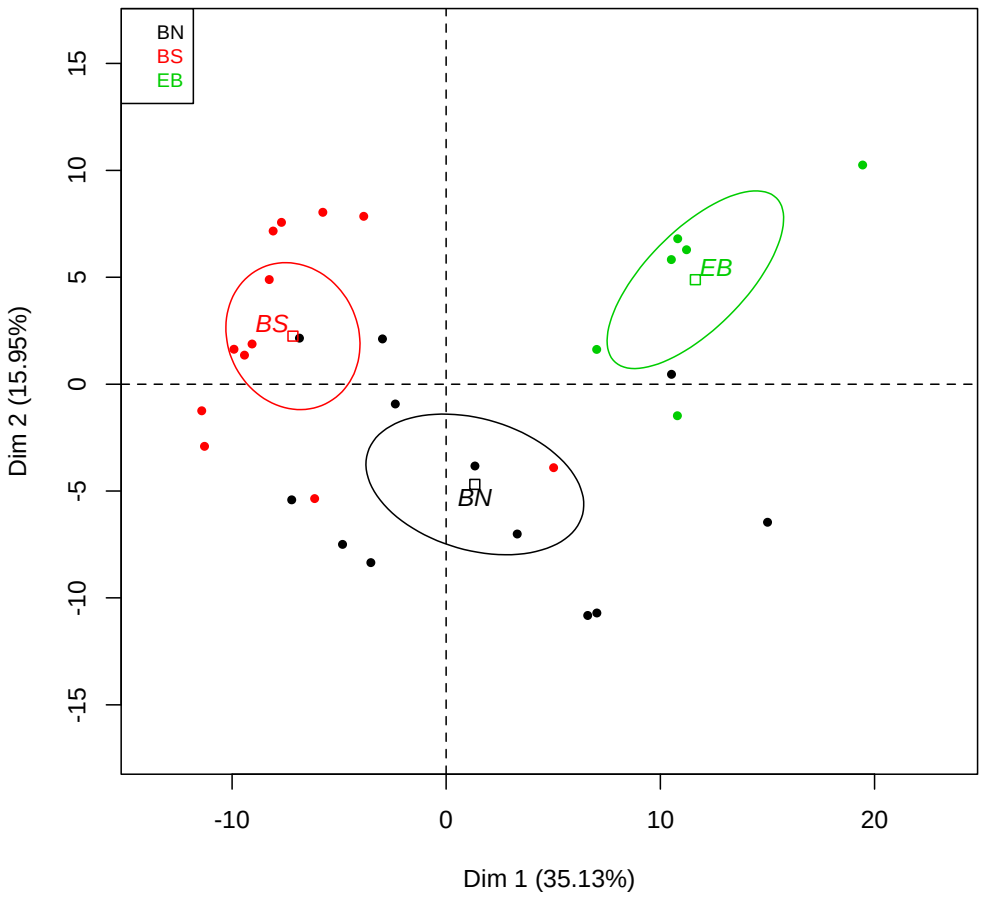

Figure 25. Analyse en composantes principales (ACP) des communautés bactériennes colonisant les différents types de bois, *i.e.* bois nécrosé (BN), bois apparemment sain (BS) et extrémité des bras (EB), des ceps de vignes échantillonnés dans le Nord de la Tunisie. La variabilité (%) expliquée par chaque axe est indiquée entre parenthèses. Les ellipses correspondent aux intervalles de confiance à 95%.

3.2 Caractérisation des souches bactériennes isolées des différents échantillons de bois

Dans cet essai, 69 souches bactériennes ont été isolées à partir des 150 bûchettes échantillonnés dans différents types de tissus, *i.e.* bois nécrosé, bois apparemment sain et extrémité des bras, et déposés sur le milieu R2A. Les 19 souches les plus abondantes selon des critères morphologiques ont été sélectionnées et caractérisées par des approches biochimiques, moléculaires et métaboliques (Tableau 10).

Le séquençage des gènes codant pour l'ARNr 16S et la sous-unité bêta de l'ARN polymérase (*rpoB*) a permis d'identifier parmi les 19 souches sélectionnées, 12 espèces appartenant au genre *Bacillus*, *i.e.* *Bacillus invictae* (7 souches), *Bacillus safensis* (2 souches), *Bacillus*

amyloliquefaciens (1 souche), *Bacillus pumilus* (1 souche) et *Bacillus subtilis* (1 souche). D'autres genres/espèces bactériens ont été identifiés *: Pantoea agglomerans* (4 souches), *Curtobacterium flaccumfaciens* (1 souche), *Pseudomonas sp.* (1 souche) et *Pseudomonas fluorescens* (1 souche).

Les 5 gènes antibiotiques recherchés n'ont été tous détectés que chez une seule souche, *B. subtilis* B6. La souche *B. invictae* B14 possédait quant à elle les 4 gènes codant pour les fengycines tandis que les autres souches de *Bacillus* en exprimaient au moins 1 sur les 4 testés. Au moins un des 5 gènes recherchés a été détecté chez 3 souches parmi les 4 appartenant à *P. agglomerans*. La souche de *P. fluorescens* B5 possédait seulement le gène codant pour la fengycine A tandis que la souche *Pseudomonas* sp. B16 n'a exprimé aucun des gènes recherchés. Pour la souche *C. flaccumfaciens* B1, aucun des 5 gènes n'a été détecté.

En ce qui concerne les facteurs de promotion de croissance des plantes, *i.e.* (i) la solubilisation des phosphates et (ii) la production de sidérophores, 13 souches ont présenté une activité lorsque ces deux caractéristiques ont été évaluées (Tableau 10). (i) Les résultats ont montré que 13 souches présentaient une capacité à solubiliser les phosphates avec des diamètres variant de 5 à 30 mm après 10 jours d'incubation sur le milieu de Pikovskaya. Cinq souches bactériennes, *i.e.* trois *Bacillus* sp. (B2, B3 et B4) et deux *P. agglomerans* (B10 et B17), ont produit des zones de solubilisation supérieures à 20 mm. La souche *B. safensis* B4 était la plus efficace à solubiliser les phosphates (diamètre de 37 mm).

(ii) Les 19 souches bactériennes testées produisaient des sidérophores : 15 souches ont développé des petits halos ayant un diamètre compris entre 1 et 5 mm (sid+) ; tandis que *B. invictae* B14 et *Pseudomonas sp.* B16 ont produit des halos de décoloration plus importants, respectivement de 23 mm et 14 mm.

Tableau 10. Description et caractérisation *in vitro* des souches bactériennes isolées de différents types de bois de ceps tunisiens

Souches	Tissus	Caractérisation biochimique			Caractérisation moléculaire							Facteurs de promotion de croissance des plantes		
		Gram	Cat	Oxy	16S	*rpo*B	Bacc	FeA	FeB	FeD	FeE	Production de siderophore	Solubilisation des phosphates	Test d'hypersensibilité
B1	BS	+	-	+	*Curtobacterium flaccumfaciens*	-	-	-	-	-	-	sid^{+}	$phos^{-}$	-
B2	BN	+	+	+	*Bacillus* sp	*Bacillus invictae*	-	+	-	-	-	sid^{++}	$phos^{++}$	-
B3	BS	+	+	+	*Bacillus* sp	*Bacillus safensis*	+	+	-	-	+	sid^{+}	$phos^{++}$	-
B4	BN	+	+	+	*Bacillus* sp	*Bacillus safensis*	+	+	-	-	-	sid^{+}	$phos^{+++}$	-
B5	BN	-	+	+	*Pseudomonas fluorescens*	-	-	+	-	-	-	sid^{+}	$phos^{+}$	-
B6	BN	+	+	+	*Bacillus* sp	*Bacillus subtilis*	+	+	+	+	+	sid^{+}	$phos^{-}$	-
B7	BS	+	+	+	*Bacillus* sp	*Bacillus invictae*	+	-	+	-	-	sid^{+}	$phos^{+}$	-
B8	BS	+	-	-	*Bacillus* sp	*Bacillus pumilus*	-	+	-	-	-	sid^{+}	$phos^{+}$	-
B9	BS	+	-	+	*Bacillus* sp	*Bacillus invictae*	+	+	+	-	-	sid^{+}	$phos^{+}$	-
B10	EB	-	+	-	*Pantoea agglomerans*	-	-	-	+	-	-	sid^{+}	$phos^{++}$	-
B11	EB	+	+	+	*Bacillus* sp	*Bacillus amyloliquefaciens*	+	+	-	-	+	sid^{++}	$phos^{-}$	-
B12	EB	-	+	-	*Pantoea agglomerans*	-	-	-	+	-	-	sid^{+}	$phos^{++}$	-
B13	EB	+	+	+	*Bacillus* sp	*Bacillus invictae*	-	+	+	+	-	sid^{+}	$phos^{++}$	-
B14	BN	+	+	+	*Bacillus* sp	*Bacillus invictae*	-	+	+	+	+	sid^{+++}	$phos^{-}$	-
B15	BN	+	+	+	*Bacillus* sp	*Bacillus invictae*	+	+	+	-	+	sid^{+}	$phos^{++}$	-
B16	BN	-	+	+	*Pseudomonas sp.*	-	-	-	-	-	-	sid^{+++}	$phos^{-}$	-
B17	BS	-	+	-	*Pantoea agglomerans*	-	-	-	-	-	-	sid^{+}	$phos^{++}$	-
B18	BS	+	+	+	*Bacillus* sp	*Bacillus invictae*	-	+	+	-	-	sid^{+}	$phos^{+}$	-
B19	BS	-	+	-	*Pantoea agglomerans*	-	+	-	-	-	-	sid^{+}	$phos^{-}$	-

BS : bois sain, BN : bois nécrosé, EB : extrémité des bras, cat : catalase, oxy : oxydase, Fe : fengycine et Bacc : bacillomycine.

3.3 Dégradation de sources carbonées par les bactéries isolées (Biolog EcoPlate™)

La distribution des souches bactériennes sur le plan principal généré par l'ACP est présentée sur la figure 26. Les deux premiers axes, Dim 1 et Dim 2, expliquent 50% de la variabilité totale. Comparées aux souches appartenant à *Bacillus* spp., celles de *P. agglomerans* sont plus dispersées sur le plan suivant l'axe Dim 1. Aucun profil particulier dans l'utilisation des sources carbonées n'a cependant été obtenu pour les 19 souches testées (P>0.05) (non montré). Le calcul de l'AWCD (Average Well Color Development) pour chacun des isolats a montré que la totalité des souches bactériennes était capable de cataboliser au moins 7 sources carbonées après 24, 48 et 120 h d'incubation des plaques. La souche *P. agglomerans* B19 était la plus efficace à dégrader la majorité des sources carbonées après une période de 5 jours (non montré). Aucune différence n'a également été observée entre les bactéries lorsque que le type de tissus dont elles ont été isolées, *i.e.* sain ou nécrosé, était pris en compte (P>0.05) (non montré).

3.4 Caractérisation biologiques des bactéries isolées : test d'hypersensibilité sur tabac

Après les injections des suspensions bactériennes dans l'espace intercellulaire de feuilles de tabac, aucune zone nécrotique n'a été observée après 24 h et 48 h d'infiltration pour les 19 souches testées en comparaison avec le témoin négatif.

3.5 Antagonisme *in vitro* entre les bactéries isolées et trois pathogènes fongiques, *i.e. L. pseudotheobromae, N. parvum* et *S. commune*

Les tests de confrontation ont montré que seulement 11 bactéries sur les 19 testées étaient capables de réduire la croissance mycélienne du phytopathogène *N. parvum* avec des pourcentages d'inhibition variant de 6.7 à 81.5%. Les souches B6 et B11 étaient les plus efficaces, avec des taux d'inhibition de respectivement 81.5 et 71.23% (Fig. 27 A1). Pour *L. pseudotheobromae*, 9 souches étaient capables d'inhiber sa croissance mycélienne avec des pourcentages d'inhibition allant de 2.5 à 70.8% (Fig. 27B1). Concernant *S. commune,* seule une souche s'est montrée incapable d'inhiber sa croissance mycélienne (Fig. 27C1).

Il est intéressant de noter que 6 souches, *i.e.* B4, B6, B11, B15, B16 et B18, ont été capables de réduire le développement des 3 pathogènes fongiques. La souche *B. subtilis* B6 (A2, B2, C2) a été la plus efficace avec des pourcentages d'inhibition allant de 67.6 à 81.5%.

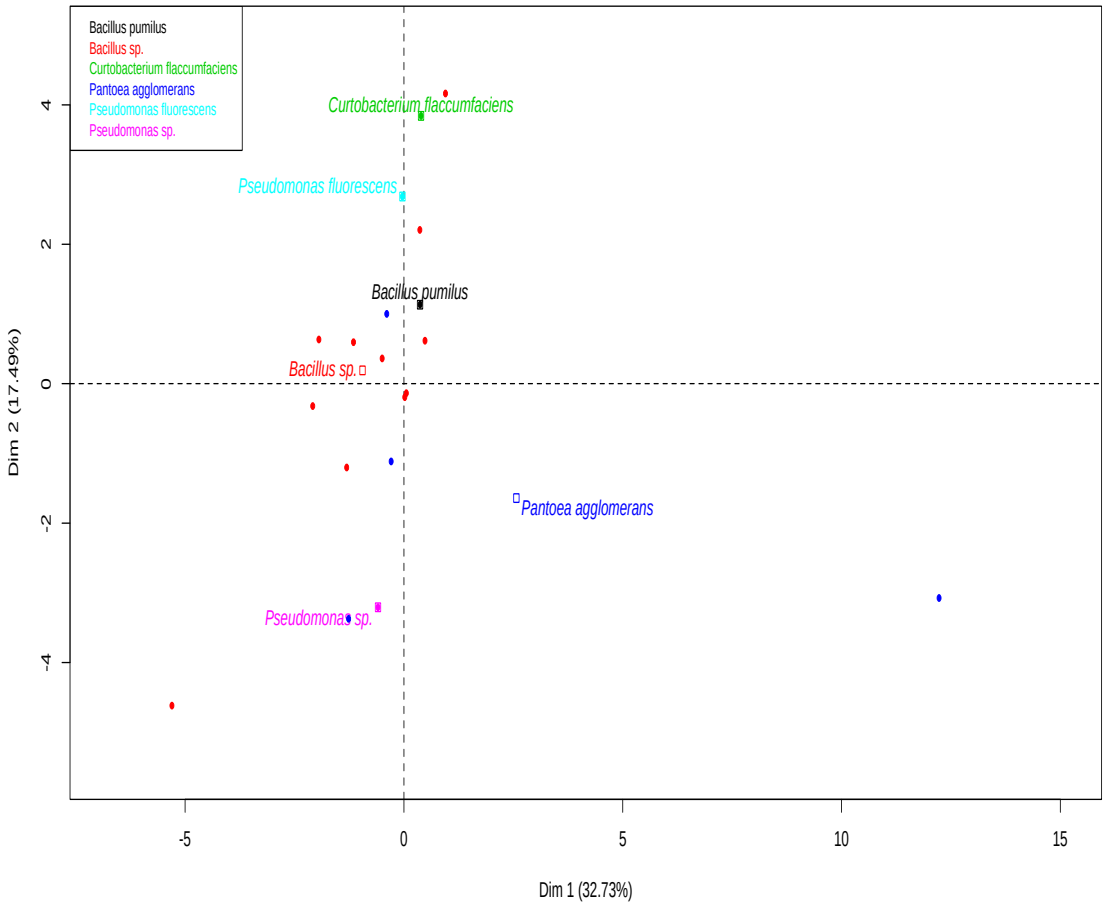

Figure 26. Analyse en composantes principales (ACP) des souches bactériennes isolées des tissus ligneux de ceps de vigne tunisiens en fonction de leurs profils cataboliques obtenus avec des plaques Biolog Ecoplates™. La variation (%) expliquée par chaque axe est indiquée entre parenthèses. Les points représentent la moyenne de trois répétitions pour chaque souche. Les plaques Biolog Ecoplates™ ont été incubées à l'obscurité pendant 48h à 27°C.

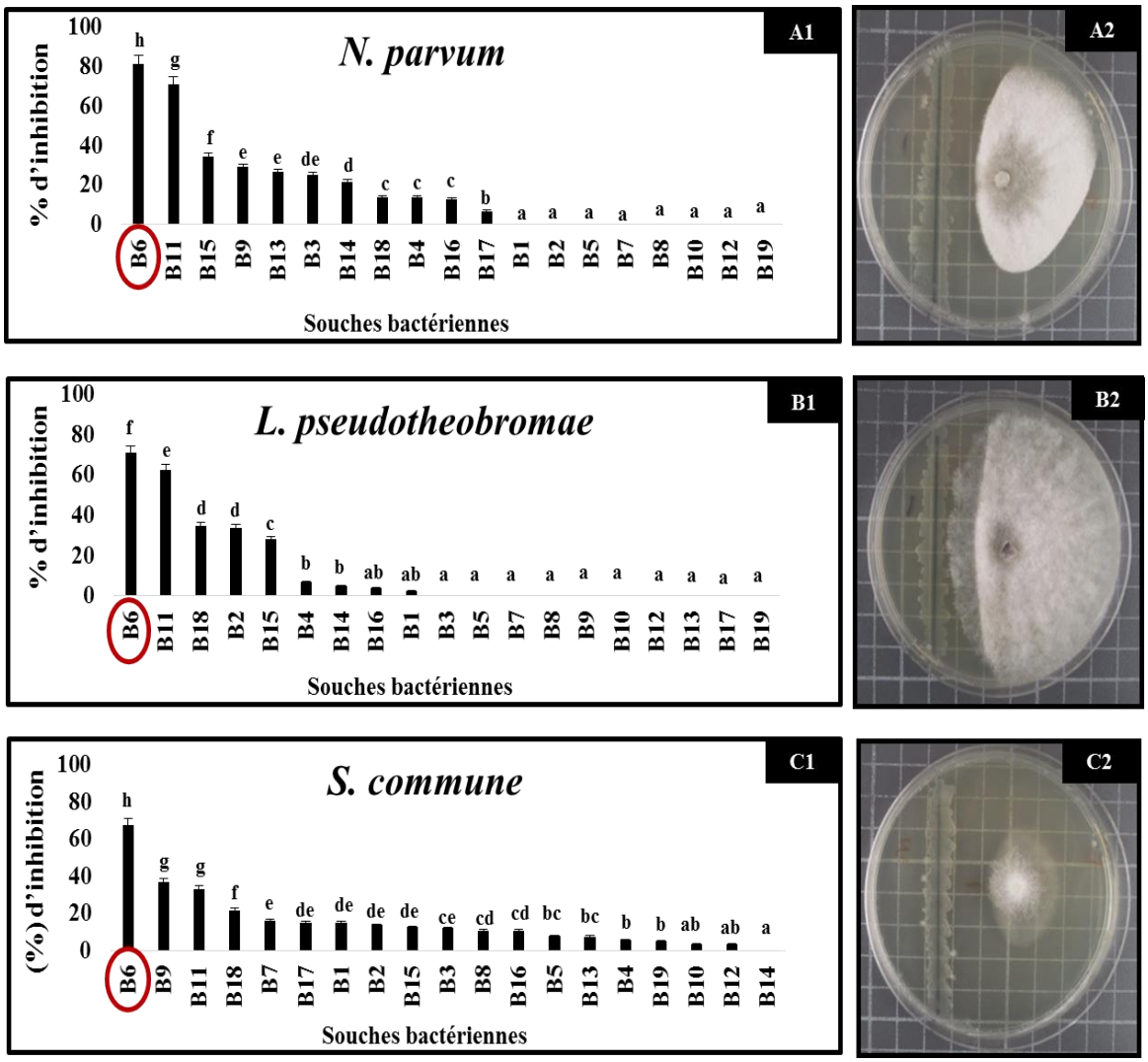

Figure 27. Effet des isolats bactériens et principalement la souche B6 sur la croissance mycélienne *in vitro* de trois champignons impliqués dans les MDBs : *Neofusicoccum parvum* (A), *Lasidiodiplodia pseudotheobromae* (B) et *Schizophyllum commune* (C). Les données sont les moyennes de 3 répétitions ± l'erreur standard pour chaque souche testée. Les barres d'histogramme avec la même lettre ne présentent pas de différences significatives (P>0.05) d'après le test de Kruskal-Wallis

4. Discussion

Cette étude a permis de montrer par des approches moléculaires, microbiologiques et biochimiques que des communautés bactériennes complexes et diversifiées colonisent les différents tissus de ceps de vigne ayant exprimé ou non les symptômes foliaires typiques des MDBs dans le Nord de la Tunisie.

Différents tissus nécrosés et non nécrosés (apparemment sains) étaient présents au niveau des bras et des troncs des ceps ayant montré des symptômes externes de MDBs. Cette observation

est en accord avec les travaux de Maher et *al.* (2012) et Bruez et *al.* (2014, 2015) réalisés en prélevant des ceps asymptomatiques et symptomatiques de l'esca dans des vignobles français. L'étude globale de la microflore bactérienne par empreinte moléculaire (SSCP) a révélé qu'une diversité et une complexité importante existait au sein des communautés bactériennes colonisant les différents tissus ligneux des ceps de vigne tunisiens. Ces communautés sont spécifiques des tissus qu'elles colonisent puisqu'elles diffèrent significativement dans les tissus nécrosés et ceux apparemment sains. Le même type d'informations a été rapporté par Bruez et *al.* (2015) sur cv. Cabernet Sauvignon en France. Ces résultats confirment donc que, quelque soit le cultivar et le pays dans lequel les ceps sont échantillonnés, des communautés bactériennes très importantes colonisent les tissus nécrosés et ceux apparemment sains chez la vigne.

L'échantillonnage réalisé sur les tissus ligneux a permis d'isoler 69 souches bactériennes à partir des ceps de vigne cv. Muscat d'Italie originaires de Tunisie. Dont les 19 souches les plus abondantes selon des critères morphologiques, ont été sélectionnées et spécifiquement caractérisées par plusieurs techniques moléculaires, biochimiques et biologiques. L'identification moléculaire de ces souches par séquençage des gènes de l'ADNr 16S et de la sous-unité bêta de l'ARN polymérase (*rpoB*) a apporté des indications précieuses sur les espèces qui colonisent fréquemment le bois de vigne. Certaines d'entre elles, non pathogènes de plantes, seront prioritairement utilisées pour des tests ultérieurs de protection de la vigne contre l'esca. En effet, leur identification moléculaire a permis d'assigner ces souches bactériennes aux 4 genres suivants : *Bacillus* (12 souches), *Pantoea* (4 souches), *Pseudomonas* (2 souches) et *Curtobacterium* (1 souche). Le genre *Bacillus* était donc le plus répandu. Dans la littérature, West et *al.* (2010), Compant et *al.* (2011), Marasco et *al.* (2013) et Pinto et *al.* (2014) ont montré que la majorité des bactéries endophytes des fleurs, des feuilles, des baies, des graines et des racines de vigne appartenaient également aux mêmes genres bactériens. Des études récentes (Compant et *al*., 2011 ; Rolli et *al*., 2015) ont montré qu'outre *Bacillus* spp., les différents tissus et organes de la vigne étaient colonisés par *Pseudomonas* spp. et *Pantoea agglomerans*.

En ce qui concerne les propriétés biologiques des espèces bactériennes tunisiennes sélectionnées, de nombreuses études ont montré que ces bactéries, principalement les *Bacillus* spp., sont connues comme étant des micro-organismes bénéfiques pour les plantes hôtes. En effet, certaines espèces telles que *B. amyloliquefaciens* possèdent un large spectre d'activités antifongiques (Alfonzo et *al*., 2012) et peuvent donc protéger les plantes, dont la vigne (Trotel-Aziz et *al*., 2008 ; Haidar et *al*., 2016) ou la tomate (Sadfi-Zouaoui et *al*., 2008) des attaques pathogènes. Par conséquent, nos résultats confirment ces études antérieures et montrent pour la première fois que les bactéries isolées du bois de ceps tunisiens ont des traits antagonistes (*e.g.*

gènes d'antibiotiques, production de sidérophores, solubilisation des phosphates et métabolisation de différentes sources de carbone) et qu'elles sont efficaces *in vitro* pour inhiber le développement d'agents pathogènes impliqués dans les MDBs.

En ce concentrant sur les traits antagonistes étudiées, les expérimentations ont montré que :

(i) Les 12 souches de *Bacillus* étudiées exprimaient de manière différentielle au moins un des 5 gènes d'antibiotiques recherchés. Seule la souche *B. subtilis* B6 possédait les 5 gènes. Ces résultats sont en accord avec Jacques et *al*. (1999) pour *B. subtilis* et Koumoutsi et *al*. (2004) pour *B. amyloliquefaciens* concernant la production de fengycines. D'après la littérature, la fonction des fengycines et de la bacillomycine est liée à des propriétés antimicrobiennes qui se traduisent par des activités fongitoxiques spécifiques contre les champignons filamenteux (Nishikori et *al*., 1986 ; Hofemeister et *al*., 2004 ; Koumoutsi et *al*., 2004 ; Jourdan et *al*., 2009). La famille des iturines (dont fait partie la bacillomycine) a d'ailleurs été montrée comme ayant des actions antifongiques fortes *in vitro* contre une large gamme de levures et de champignons.

(ii) La souche *Pseudomonas* sp. B16 est la plus efficace pour produire des sidérophores, molécules permettant de capter le Fer et ayant un rôle important dans la lutte contre certaines maladies des plantes et l'inhibition du développement de plusieurs agents phytopathogènes (Duffy et Defago, 1999 ; Whipps, 2001). Le même type d'information a été rapporté par Cabrefiga et *al*. (2007) et Renault et *al*. (2007) chez des *Pseudomonas* spp. isolés d'autres milieux environnementaux.

(iii) En ce qui concerne la solubilisation des phosphates, la souche *B. safensis* B4 a été la plus efficace. Ce phénomène est impliqué dans la nutrition (Goldstein, 1986) et la promotion de la croissance des plantes (Chabot et *al*., 1993, 1996a, 1996b ; Rodriguez et Fraga, 1999).

(iv) Au niveau du métabolisme global des bactéries isolées et de leur compétition pour les nutriments, une métabolisation des substrats carbonés a été obtenue dès 24h d'incubation. Le groupe des glucides a été le plus intensément métabolisé par les 19 souches bactériennes après 24, 48 et 120 h d'incubation, et la souche *P. agglomerans* B19 a été la plus rapide et la plus efficace à dégrader les différents substrats.

La capacité des souches sélectionnées à agir en tant qu'antagonistes fongiques a été évaluée par des tests de confrontations *in vitro* contre trois pathogènes fongiques impliqués dans les MDBs, *i.e. L. pseudotheobromae, N. parvum* et *S. commune*. Dans cet essai, la souche *B. subtilis* B6 s'est montrée la plus efficace à inhiber la croissance mycélienne des trois pathogènes fongiques. Cette souche a donc été sélectionnée pour des essais *in planta* sur cv. Cabernet Sauvignon et cv. Muscat d'Italie en serre (cf Chapitre Résultats et discussions, Chapitre 3). Dans une autre étude, Alfonzo et *al*. (2008) ont montré l'efficacité d'une souche de *B. subtilis* à

inhiber la croissance mycélienne *in vitro* des 3 champignons pathogènes impliqués dans l'esca, *i.e. Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaemoniella chlamydospora* et *Fomitiporia mediterranea*. Les souches de *B. subtilis* semblent donc être des agents de biocontrôle potentiellement intéressants pour lutter contre les pathogènes impliqués dans les MDBs.

En conclusion, cette partie de la thèse a permis de montrer que le bois de ceps de vigne tunisiens est colonisé par un nombre très important de bactéries dont les fonctions de 19 souches bactériennes les plus abondantes ont été étudiées. La majorité des souches isolées appartiennent au genre *Bacillus* et les différentes propriétés antagonistes de plusieurs d'entre elles ont été montrées. De ce fait, ces souches sont des candidates potentielles intéressantes pour lutter biologiquement contre l'esca.

Chapitre 3

Essai de protection *in planta* des ceps de vignes cv. Cabernet Sauvignon et Muscat d'Italie contre l'attaque de *Neofusicoccum parvum* et *Phaeomoniella chlamydospora*

Awatef REZGUI, Asma Ben Ghnaya-Chakroun, Jessica Vallance, Emilie Bruez, Mokhtar Dridi, Mayssa Arfaoui, Patrice Rey et Najla Sadfi-Zouaoui. Different antifungal effects of *Bacillus subtilis* and *Pantoea agglomerans* on cv. Cabernet Sauvignon and cv. Muscat d'Italie, two grapevines cultivars against two Grapevine Trunk Diseases (GTDs) pathogens, *Neofusicoccum parvum* and *Phaeomoniella chlamydospora.* Cette publication sera soumise dans une revue internationale fin Décembre.

1. Introduction

L'esca est une maladie à l'étiologie complexe qui est associée à un cortège de champignons pathogènes. Dans ce chapitre, deux de ces pathogènes ont été étudiés : *Neofusicoccum parvum* et *Phaeomoniella chlamydospora*. *N. parvum* est considéré comme l'une des espèces fongiques les plus virulentes associée au MDBs (Laveau et *al*., 2009). Elle est associée à la fois aux nécroses internes du bois mais également aux chancres externes (Phillips, 2002; Laveau et *al*., 2009; Amponsah et *al*., 2011). *P. chlamydospora* dégrade le bois de vigne en créant divers types de nécroses : une nécrose centrale, une nécrose sectorielle et une pourriture blanche (amadou), typiquement associée à l'esca (Maher et *al*., 2012). Malgré l'importance et la gravité de cette maladie, aucun moyen de lutte chimique n'existe actuellement depuis l'interdiction de l'arsénite de sodium en 2001 en Europe et dans le monde. C'était le seul pesticide homologué pour contrôler les MDBs (Decoin, 2001; Larignon et *al*., 2008). Aujourd'hui, il est donc important d'axer la recherche pour trouver de nouvelles méthodes alternatives, comme l'utilisation d'agents de biocontrôle. Plusieurs micro-organismes ont déjà été testés contre les MDBs : le champignon *Trichoderma atroviride* (Kotze et *al*., 2001), des levures et des bactéries (Bertsch et *al*., 2013; Compant et *al*., 2013 ; Haidar et *al*., 2016), et l'oomycète *Pythium oligandrum*, dont les résultats ont montré une protection des plantes face à l'infection par *P. chlamydospora* (Yacoub et *al*., 2016).

Lors de cette étude, l'efficacité de deux souches bactériennes a été testée sur la réduction des nécroses causées par les deux agents pathogènes *P. chlamydospora* et *N. parvum*. L'une des souches était d'origine tunisienne, *i.e. Bacillus subtilis* B6 isolée de ceps cv. Muscat d'Italie et caractérisée au Chapitre 2 ; et l'autre d'origine française, *i.e. Pantoea agglomerans* S5 isolée de cv. Cabernet Sauvignon (Bruez et *al*., 2015 ; Haidar et *al*., 2016). Les essais de protection *in planta* ont été réalisés sur deux cépages : le Cabernet-Sauvignon, qui est un cépage destiné à la production de vin et qui très implanté en France, et le Muscat d'Italie, qui est le premier cépage cultivé en Tunisie en tant que raisin de table.

2. Objectifs

Les objectifs de cette étude étaient de :

(i) Trouver un antagoniste biologique capable de réduire les nécroses dues aux pathogènes impliqués dans l'esca ;

(ii) Étudier l'effet variétal des ceps de vigne du point de vue de la sensibilité aux attaques fongiques ;

(iii) Étudier l'adaptation des antagonistes biologiques à l'environnement de la plante afin de la protéger contre les agressions artificielles provoquées et,

(iv) Étudier l'effet de l'introduction d'un antagoniste biologique sur les microflores bactériennes et fongiques indigènes de la vigne.

3. Résultats

L'objectif de cet essai croisé était d'étudier le potentiel antagoniste *in planta* des deux souches bactériennes sélectionnées : la souche tunisienne *Bacillus subtilis* B6 choisie en fonction des tests de confrontation *in vitro* décrits dans le Chapitre 2, et la souche française *Pantoea agglomerans* S5 choisie d'après les travaux déjà réalisés dans le laboratoire par Bruez et *al*. (2015) et Haidar et *al*. (2016). Les résultats obtenus pour les deux cultivars de vignes utilisés, *i.e.* Muscat d'Italie et Cabernet Sauvignon, ont été comparés.

3.1 Mise en évidence des lésions externes et internes induites chez la vigne suite à l'attaque artificielle par les deux champignons *N. parvum* et *P. chlamydospora*

Quatre mois après l'infection artificielle des boutures, les symptômes induits par les deux champignons pathogènes ont été observés et mesurés. *N. parvum* et *P. chlamydospora* ont induit des lésions facilement identifiables par rapport au tissu sain sur et dans la tige des boutures des deux cultivars testés, *i.e.* Cabernet Sauvignon et Muscat d'Italie (Fig. 28, 29).

Au niveau externe, des chancres ont été observés seulement sur les boutures ayant subi une inoculation par *N. parvum* (Fig. 28C), tandis que les plantules infestées par *P. chlamydospora* n'ont pas manifesté ce type de lésions.

Au niveau interne, après section longitudinale des boutures de vignes, il a été montré que les nécroses s'observaient au niveau du site d'infection mais qu'elles se propageaient également sur toute la longueur des tiges (Fig. 28A, B). La taille des lésions obtenues était dépendante de l'inoculum utilisé ; des dégâts plus importants ont été observés avec *N. parvum* comparé à *P. chlamydospora* sur les deux variétés étudiées (Fig. 29).

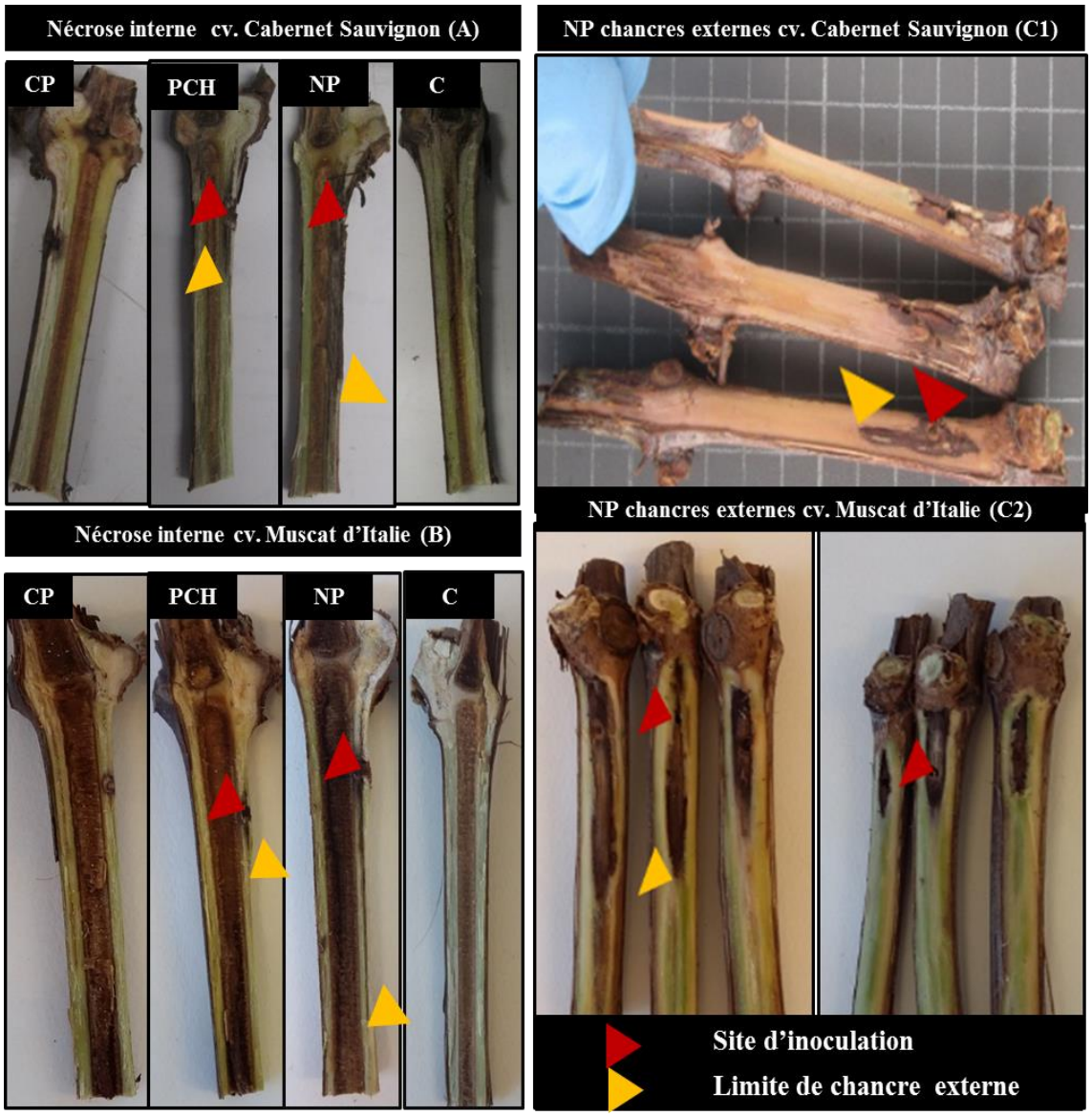

Figure 28. Mise en évidence des nécroses internes et externes respectivement sur boutures de Cabernet Sauvignon (A, C1) et Muscat d'Italie (B, C2), 4 mois après l'inoculation par *P. chlamydospora* et *N. parvum. Pch :* plante inoculée par *P. chlamydospora, Np :* plante inoculée par *N. parvum,* C *:* plante saine n'ayant subi aucun traitement et CP: plante témoin inoculée par milieu liquide TSB et un disque stérile de MA.

3.2 Effet des bactéries antagonistes sélectionnées sur la réduction des nécroses causées par *N. parvum*

Pour les deux cépages testés, la réduction du pourcentage de nécroses externes et internes variait significativement ($P<0.05$) en fonction des inoculums bactériens utilisés. Lors de ces essais, les témoins négatifs (C) n'ont présenté aucune lésion, tandis que les témoins « percés » (CP) ainsi que les plants inoculés par les souches bactériennes seules ou en association (B6, S5 et S6+B5) ont présenté des petites nécroses internes dues au perçage lors des inoculations artificielles (effet perçage) (Fig. 29).

Sur les boutures cv. Cabernet Sauvignon, l'efficacité des antagonistes bactériens à réduire significativement les nécroses internes a été démontrée lors des traitements avec la bactérie S5 seule (souche issue de cépage français) et la combinaison B6+S5 ($P<0.05$) avec des pourcentages de réduction respectifs de 20 et 36%. Les taux de nécroses obtenus avec *N. parvum* seul ayant été de 89%, la combinaison des deux souches B6 et S5 serait donc la meilleure pour protéger les plants de vigne des attaques par ce champignon (Fig. 29B).

Concernant les plants cv. Muscat d'Italie, un effet protecteur a été observé pour les trois conditions antagonistes testées, *i.e.* B6, S5 et B6+S5, puisque les taux de réduction des nécroses internes obtenus étaient respectivement de 35%, 40% et 53%. Aucune différence significative entre les 3 combinaisons de bactéries n'a été mise en évidence. Les taux de nécroses causés par *N. parvum* sur ce cépage étaient, comme sur Cabernet Sauvignon, de l'ordre de 80% (Fig. 29B).

Au niveau des lésions externes, les résultats obtenus (Fig. 29C) ont montré une différence significative de la réduction de la longueur des chancres sur les tiges pour les boutures cv. Cabernet Sauvignon et cv. Muscat d'Italie ayant subi un traitement bactérien par rapport au témoin positif *N. parvum* ($P<0.05$). La souche B6 n'est pas efficace à réduire les attaques externes par *N. parvum* ($P>0.05$), et ce pour les deux cultivars testés. En revanche, l'efficacité des antagonistes bactériens à réduire significativement les nécroses externes a été démontrée lors des traitements avec la bactérie S5 seule ou en combinaison avec B6 ($P<0.05$) avec des pourcentages de réduction respectifs de 25.84% et 26.67% sur cv. Cabernet Sauvignon et 21.75% et 23.69% sur cv Muscat d'Italie.

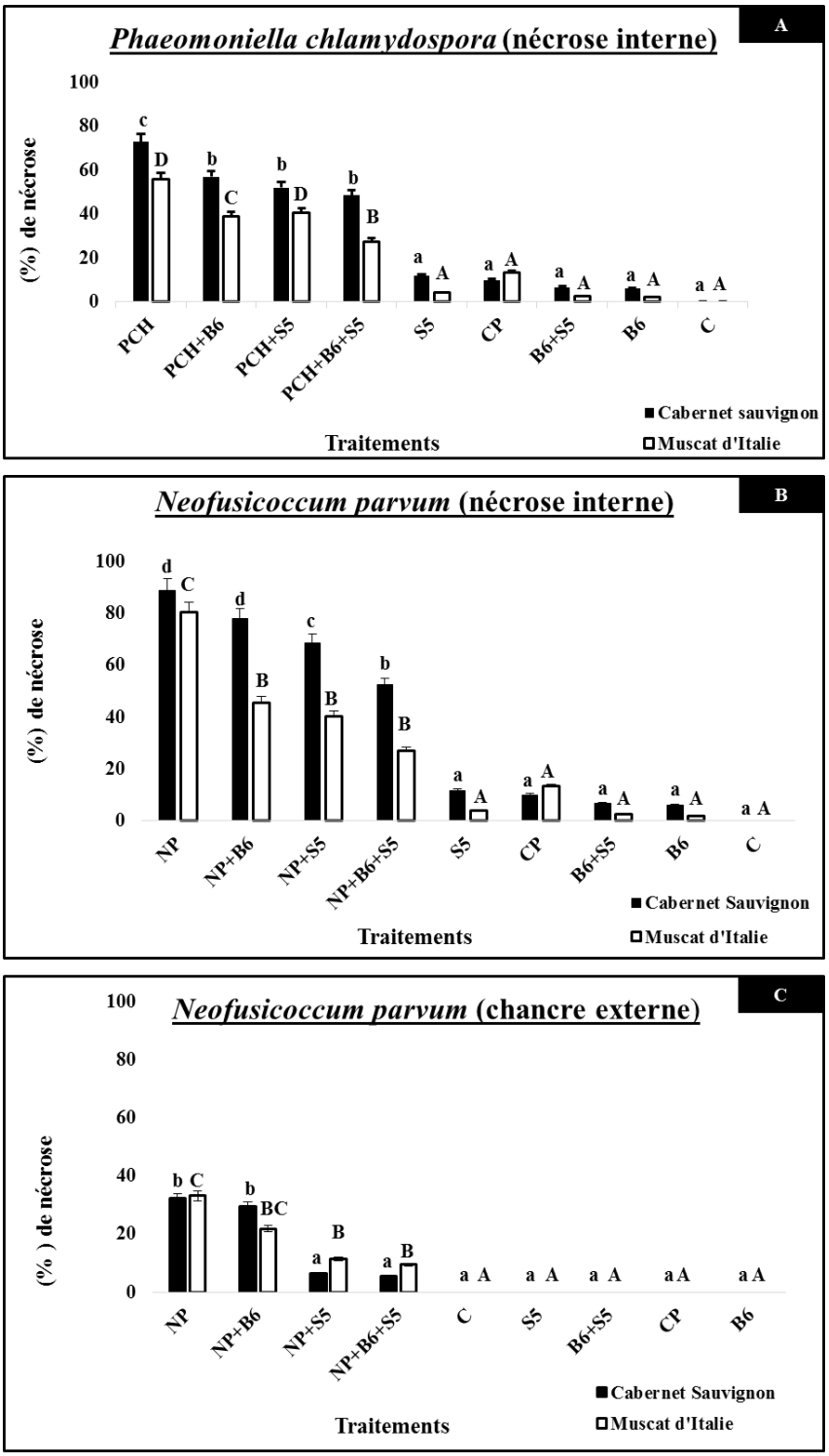

Figure 29. Mise en évidence de l'efficacité des trois traitements biologiques B6, S5 et B6+ S5 à réduire respectivement la taille des nécroses internes dues à *P. chlamydospora* (A) ou *N. parvum* (B) et externes dues à *N. parvum* (C) sur Cabernet Sauvignon et Muscat d'Italie.

C : contrôle négatif n'ayant subi aucun traitement biologique, CP : contrôle négatif percé.

Les barres de données présentant la même lettre minuscule ou majuscule ne diffèrent pas significativement entre elles, P> 0.05 par le test de Kruskal-Wallis.

3.3 Effet des bactéries antagonistes sur la réduction des nécroses internes causées par *P. chlamydospora*

Quatre mois après inoculation du pathogène fongique *P. chlamydospora*, les pourcentages de nécroses atteints sur les boutures témoins positifs étaient de 56% et 73% respectivement sur Muscat d'Italie et Cabernet Sauvignon, tandis que sur les boutures témoins négatifs ayant subi un perçage (CP), les pourcentages de nécroses observés étaient de l'ordre de 10% (effet perçage) (Fig. 29A)

De la même manière que dans l'essai avec *N. parvum*, la réduction du pourcentage de nécroses internes variait significativement ($P<0.05$) en fonction des inoculums bactériens utilisés pour les deux cépages testés.

Les résultats obtenus pour la variété Cabernet Sauvignon (Fig. 29A), ont montré que les différents traitements antagonistes appliqués ont significativement réduit les nécroses internes ($P<0.05$) avec des taux de réduction de l'ordre de 20%. Aucune différence entre les trois traitements entrepris ($P>0.05$) n'a été mise en évidence.

Pour la variété Muscat d'Italie, l'application des antagonistes biologiques a réussi à protéger les boutures de vigne contre l'attaque par *P. chlamydospora* en réduisant significativement les pourcentages de nécroses ($P<0.05$) excepté le traitement par la souche S5 (Fig. 29A). Il sera intéressant de noter que d'après les résultats obtenus une différence significative entre les deux traitements *P. chlamydospora*+B6 et *P. chlamydospora*+B6+S5 ($P<0.05$) a été mise en évidence. L'effet protecteur des deux bactéries en association serait donc plus efficace, le taux de réduction des nécroses observé ayant été de 28%.

3.4 Comparaison de l'efficacité des antagonistes biologiques à réduire les nécroses internes en fonction des cultivars traités

Les résultats obtenus montrent qu'il existe un effet variétal jouant un rôle important pour la protection des plantes contre les deux pathogènes *N. parvum* et *P. chlamydospora*. La variété Muscat d'Italie semble plus résistante à l'attaque par le pathogène *P. chlamydospora* comparé au Cabernet Sauvignon, alors qu'il n'existe pas une telle différence pour *N. parvum*.

Après comparaison deux à deux des six traitements biologiques entrepris, *i.e. N. parvum*+B6, *N. parvum*+S5, *N. parvum*+B6+S5, *P. chlamydospora*+B6, *P. chlamydospora*+S5 et *P. chlamydospora*+B6+S5, une différence a été mise en évidence en fonction du cultivar inoculé ($P<0.05$).

Il sera intéressant de noter que tous les traitements biologiques semblent avoir mieux protégé les vignes de cépage Muscat d'Italie contre les agressions dues à *N. parvum* ou *P. chlamydospora* comparés au cépage Cabernet Sauvignon excepté pour le traitement biologique *P. chlamydospora*+S5 (Fig. 29).

3.5 Effet des traitements antagonistes sur les communautés bactériennes et fongiques des tissus ligneux des boutures de vigne

Lors de cet essai sous serre, une fois les boutures coupées longitudinalement pour la lecture des nécroses, des échantillons de tissus ont été prélevés pour étudier les communautés bactériennes et fongiques par empreinte moléculaire, *i.e.* SSCP. Pour douze des traitements testés, *i.e.* CP, B6, S5, B6+S5, NP, NP+B6, NP+S5, NP+B6+S5, PCH, PCH+B6, PCH+S5, PCH+B6+S5, les tissus de bois de 10 boutures choisies au hasard ont été regroupés en 3 pools d'échantillons (3+3+4) avant extraction des ADN et analyse SSCP. Pour chaque cultivar, un total de 36 profils SSCP a donc été obtenu (3 par traitement).

Le nombre de pics ainsi que le décollement de la ligne de base observés sur les profils témoignent de la diversité et de l'abondance des populations bactériennes et fongiques qui colonisent le bois des tiges des boutures des 2 cultivars, *i.e.* Cabernet Sauvignon et Muscat d'Italie (données non montrées). La structure génétique des microflores bactériennes et fongiques était d'ailleurs spécifique de chacun des cultivars étudiés comme le montre la distribution des individus sur le plan généré par l'ACP présentée sur la figure 30A (résultats identiques pour les champignons mais non montrés).

3.5.1 Influence de la co-inoculation de deux souches bactériennes avec *N. parvum* sur les microbiotes bactérien et fongique

Concernant le microbiote bactérien, l'ACP des profils SSCP fondée sur les deux premiers axes, Dim1 et Dim 2 (80.51% de la variabilité totale), montre que les populations bactériennes étaient différentes en fonction des traitements appliqués sur les boutures cv. Cabernet Sauvignon. En effet, la microflore bactérienne des boutures co-inoculées par *N. parvum* et la combinaison B6+S5 était différente de celle des boutures inoculées par *N. parvum* seul. En revanche, la communauté bactérienne présente dans les plants inoculés par le pathogène fongique ne différait pas de celle des plants inoculés par le pathogène et ayant subi un traitement bactérien avec B6 ou S5 (Fig. 30B).

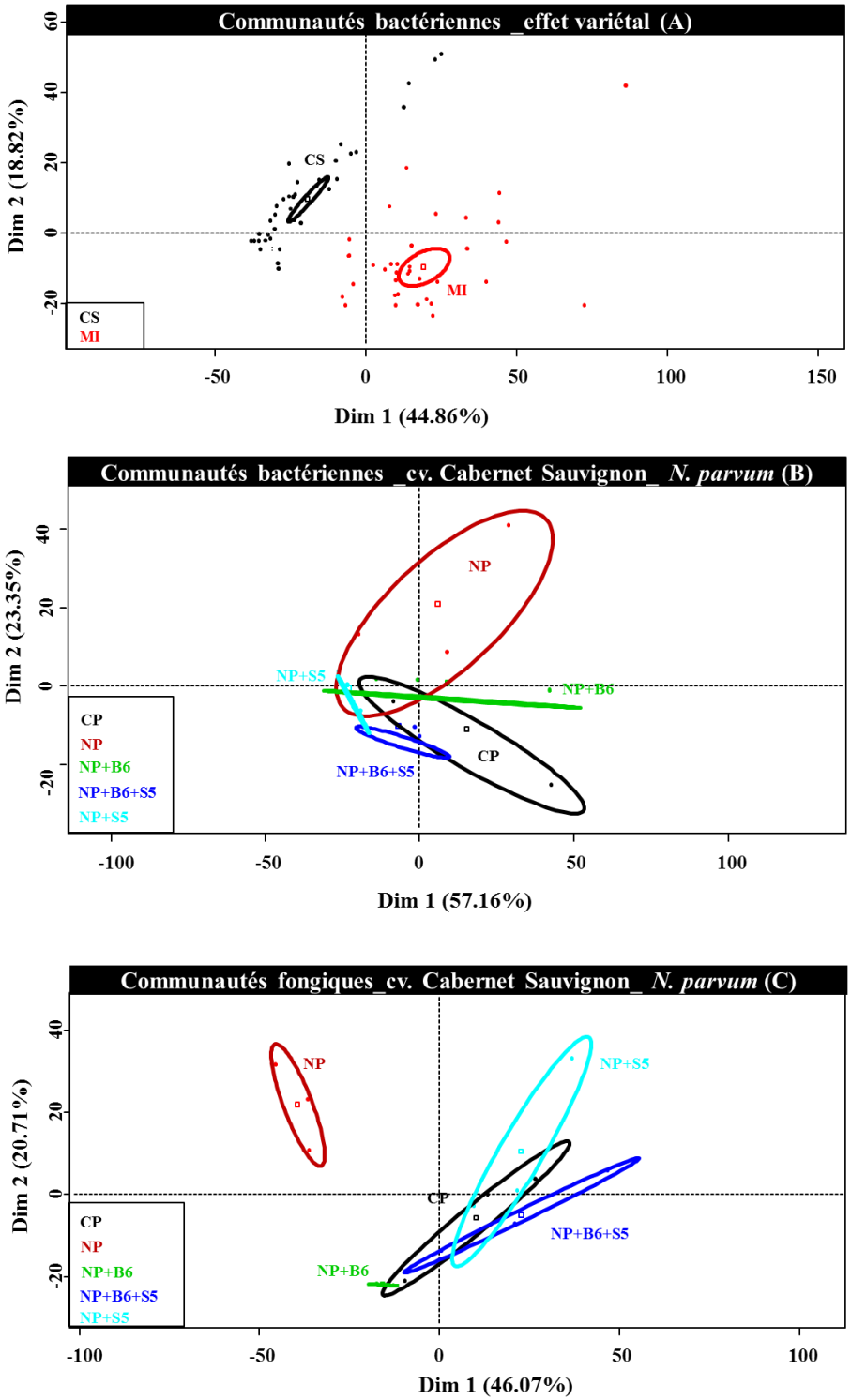

Figure 30. Mise en évidence de l'effet variétal sur les communautés bactériennes colonisant le bois de vigne cv. Cabernet Sauvignon et Muscat d'Italie (A). ACP des communautés bactériennes (B) et fongiques (C) colonisant le bois de boutures cv. Cabernet sauvignon traitées par *N. parvum*. Les ellipses correspondent à l'intervalle de confiance à 95%.

Pour le cultivar Muscat d'Italie, aucune différence dans la structure génétique des populations de bactéries n'a été mise en évidence entre les différents traitements (non montré).

Au niveau du microbiote fongique, l'analyse des profils SSCP (Fig. 30C) montre que les populations étaient différentes en fonction des traitements appliqués sur le cultivar Cabernet Sauvignon. En effet, l'axe Dim 1, qui représente 46.07% de la variabilité fongique totale, oppose les microflores des boutures inoculées par *N. parvum* ou *N. parvum*+B6 aux boutures inoculées par *N. parvum*+S5 et éventuellement *N. parvum*+B6+S5. L'axe Dim 2 (20.71%) oppose quant à lui, les communautés fongiques des boutures inoculées par *N. parvum* à celles du traitement *N. parvum*+B6. Pour le cultivar Muscat d'Italie, les populations fongiques ne différaient pas en fonction des traitements appliqués (non montré).

3.5.2 Influence de la co-inoculation de deux souches bactériennes avec *P. chlamydospora* sur les microbiotes bactérien et fongique

Concernant le microbiote bactérien des boutures cv. Cabernet Sauvignon et cv. Muscat d'Italie, les résultats ne montrent aucune différence de structure génétique des populations bactériennes dans les différents traitements entrepris pour ces deux cultivars (non montré).

Au niveau du microbiote fongique, les analyses ont mis en évidence des différences de microflore entre les traitements appliqués pour les deux cultivars testés. Sur Cabernet Sauvignon, les résultats d'ACP (Fig. 31A), fondés sur les deux axes principaux Dim1 et Dim 2 expliquant 59.54% de la variabilité fongique totale, montrent que les boutures inoculées par *P. chlamydospora* présentaient une microflore fongique différente des boutures inoculées par *P. chlamydospora*+S5 et *P. chlamydospora*+B6+S5 selon l'axe Dim 1 (40.05%). La souche B6 n'a, quant à elle, induit aucun changement de la microflore une fois inoculée avec *P. chlamydospora*. Le même type de résultats a été obtenu sur le cultivar Muscat d'Italie. En effet, les communautés fongiques des boutures inoculées par *P. chlamydospora* étaient différentes de celles des boutures traitées biologiquement par B6 et B6+S5, la souche S5 n'ayant induit aucun changements de microflore (Fig. 31B).

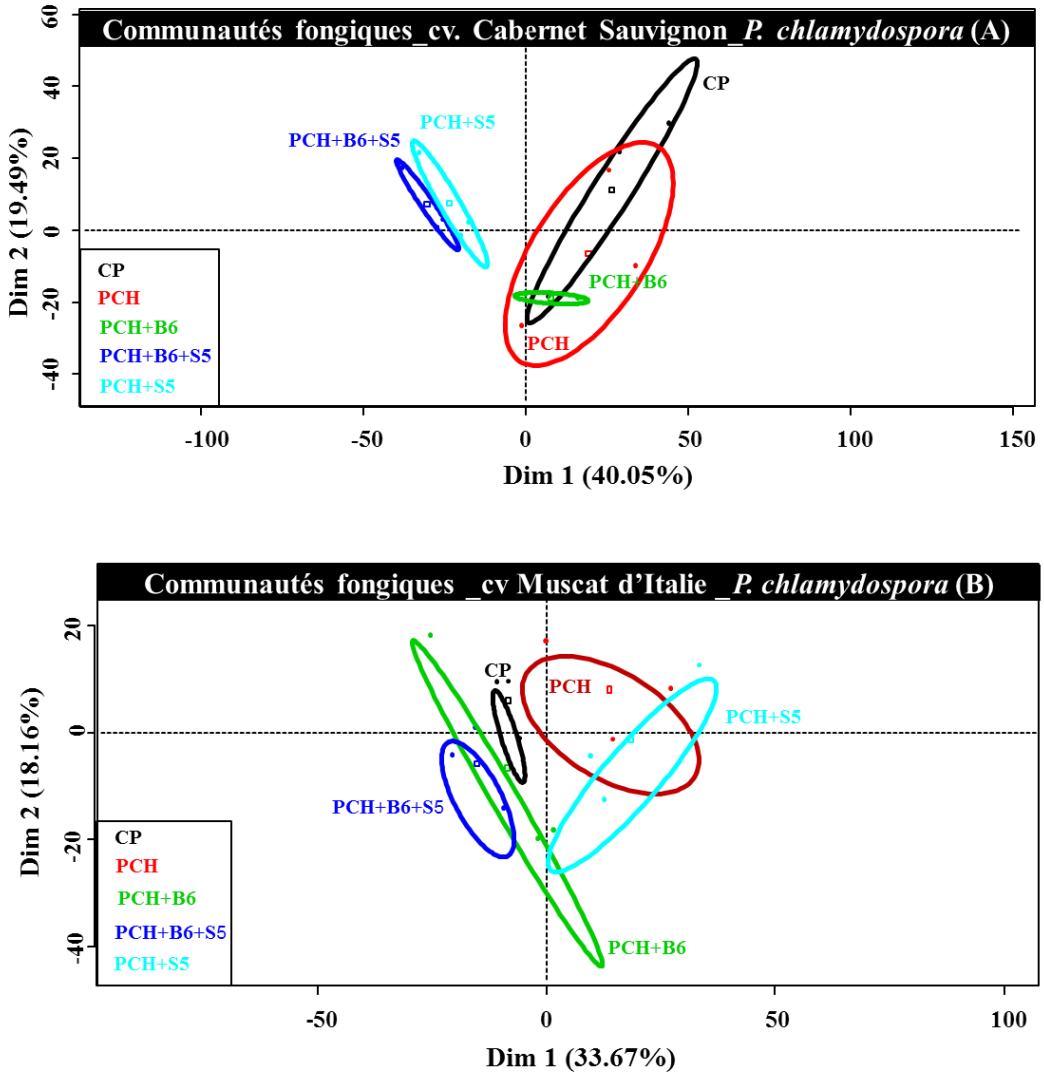

Figure 31. Analyses en composantes principales des communautés fongiques colonisant le bois de boutures cv. Cabernet sauvignon (A) et cv. Muscat d'Italie (B) traitées par *P. chlamydospora*. Les ellipses correspondent à l'intervalle de confiance à 95%.

4. Discussion

L'objectif de cette étude a été d'évaluer l'efficacité de deux souches bactériennes possédant des propriétés d'agents de biocontrôle (*i.e.* antagonistes d'agents pathogènes) pour réduire la formation de nécroses dans le bois de la vigne causées par deux agents pathogènes impliqués dans les MDBs, *i.e. N. parvum* (souche isolée de ceps tunisiens, cf Chapitre 1) et *P. chlamydospora* (souche isolée de ceps français (Laveau et *al*., 2009)). Concernant les 2 bactéries, l'une a été isolée d'un cep planté en Tunisie, *i.e. Bacillus subtilis* B6 (cf Chapitre 2), et l'autre, d'un cep provenant de France, *i.e. Pantoea agglomerans* S5 (Bruez et *al*., 2015 ; Haidar et *al*.,

2016). Deux cépages ont également été utilisés lors de cette essai croisé : le Cabernet-Sauvignon qui est un cultivar international destiné à la production de vin et qui très implanté en France, et le Muscat d'Italie, qui est le premier cépage pour le raisin de table cultivé en Tunisie.

Lors de cet essai, 4 mois après l'inoculation des plants par les champignons pathogènes, des nécroses dans le bois des cultivars Cabernet Sauvignon et Muscat d'Italie ont été observées. Ce résultat est en accord avec plusieurs études antérieures rapportées dans la littérature (Sparapano et *al*., 2001b ; Haidar et *al*., 2016 ; Rezgui et *al*., 2016 ; Yacoub et *al*., 2016). Les analyses réalisées dans le cadre de cette thèse ont montré que les dommages étaient dépendants (i) de la souche du pathogène inoculée, (ii) du cultivar, mais également (iii) des bactéries utilisées pour la protection des plants.

(i) Le phytopathogène *N. parvum* s'est montré plus agressif que *P. chlamydospora* sur les deux cépages utilisés. Les dommages causés par *N. parvum* étaient en effet plus importants, la longueur des nécroses était plus grande et la présence de chancres externes au niveau de la tige était observée. Ce dernier symptôme obtenu avec *N. parvum* est en accord avec les expérimentations récentes réalisées par Haidar et *al*. (2016).

(ii) Selon le cépage, Cabernet Sauvignon ou Muscat d'Italie, des nécroses plus ou moins importantes étaient observées. Cette sensibilité différente selon le cépage est en accord avec les observations de Sparapano et *al*. (2001b) sur les cultivars Italia et Matilde inoculés par *Fomitiporia punctata, Phaeoacremonium aleophilum* et *P. chlamydospora.* Bruez et *al*. (2013) ont aussi montré que certains cépages, *e.g.* Savagnin, Trousseau et Ugni Blanc, étaient beaucoup plus sensibles à l'esca que d'autres.

(iii) Pour l'essai de protection biologique, les deux bactéries endophytes bénéfiques, *i.e. P. agglomerans* S5 (Haidar et *al*., 2016) et *B. subtilis* B6 (Rezgui et *al*., 2016), ont été appliquées sur les 2 cultivars, Cabernet Sauvignon et Muscat d'Italie. Plusieurs études antérieures ont montré l'intérêt des bactéries, *e.g. B. subtilis* et *P. agglomerans*, comme agents de lutte biologique contre plusieurs maladies de la vigne (Ferreira et *al*., 1991; Schmidt et *al*., 2001; Magnin-Robert et *al*., 2007; Romero et *al*., 2007; Trotel-Aziz et *al*., 2008; Alfonzo et *al*., 2008, 2009; Leelasuphakul et *al*., 2008; Kotze et *al*., 2011; Compant et *al*., 2011, 2013; Haidar et *al*., 2016).

Nos résultats confirment l'intérêt des souches de ces 2 espèces bactériennes rapporté dans ces travaux antérieurs. En effet, les souches bactériennes colonisant les tissus de bois de vigne tunisiens (*B. subtilis* B6) ou les vignes françaises (*P. agglomerans* S5) ont été capables de réduire l'incidence de deux phytopathogènes impliqués dans les MDBs, *i.e. N. parvum* et *P. chlamydospora*. Cependant, un effet variétal a encore été mis en évidence en comparant les

différents essais *in planta*. La souche B6 était inefficace pour réduire les attaques dues à *N. parvum* sur Cabernet Sauvignon, mais elle était efficace sur Muscat d'Italie. Idem pour la souche S5 qui a été efficace pour réduire les attaques dues à *P. chlamydospora* principalement sur Cabernet Sauvignon. Par contre, la combinaison des deux souches bactériennes « B6 et S5 » a été efficace pour réduire l'incidence de la maladie sur les deux cultivars étudiés. Ce type de réponse peut être lié à la capacité des antagonistes biologiques à coloniser les deux cultivars. Ceux-ci peuvent en effet avoir des facteurs intrinsèques différents tels que la disponibilité en nutriments et/ou le pH, ce qui peut affecter la croissance de l'agent de biocontrôle (Lewisohn et *al*., 1992; Mutawila et *al*., 2011). Ce résultat confirme que les effets antagonistes des souches bactériennes peuvent fortement dépendre de l'agent pathogène et/ou de la variété considérée. Cette constatation est en accord avec une étude réalisée par Mutawila et *al*. (2011), qui a montré que l'effet protecteur de certaines espèces de *Trichoderma* variait en fonction du cépage traité.

Ce résultat est, à notre connaissance, le premier à avoir montré que *P. agglomerans* et *B. subtilis* avaient des propriétés d'agents de biocontrôle potentiels contre *N. parvum* et *P. chlamydospora* (Ferreira et *al*., 1991 ; Schmidt et *al*., 2001; Alfonzo et *al*., 2009; Kotze et *al*., 2011). Un tel résultat est d'une importance primordiale, car *N. parvum* est un agent pathogène pour lequel aucun traitement efficace n'existe aujourd'hui (Haidar et *al*., 2016).

Lors de cette étude, la combinaison bactérienne « B6 et S5 » était la plus adéquate pour protéger les plants de vigne des deux cépages, Muscat d'Italie et Cabernet Sauvignon. Ce résultat sur la combinaison de souches d'agents de biocontrôle est en accord avec les travaux de Mutawila et *al*. (2011), qui ont montré que l'utilisation de deux espèces de *Trichoderma* était plus efficace pour protéger les plants de vigne.

Dans une deuxième étape, l'effet de l'introduction dans les habitats cibles de la vigne des souches bactériennes *B. subtilis* B6 et/ou *P. agglomerans* S5, sur les microflores indigènes bactériennes et fongiques des ceps de vignes a été étudié par empreinte moléculaire (technique SSCP). Des études antérieures ont montré que l'introduction de bactéries bénéfiques dans un organisme pouvait perturber (Blouin-Bankhead et *al*., 2004) ou non (Scherwinski et *al*., 2008) les microflores indigènes bactérienne et fongique. Dans notre étude, les populations bactériennes et fongiques dans les tissus du bois de vigne infectés artificiellement par les pathogènes *N. parvum* et *P. chlamydospora* ont été comparées avec celles du bois co-inoculé par les pathogènes fongiques et les différents antagonistes bactériens.

Les analyses ont montré que les populations bactériennes et fongiques sont significativement différentes en fonction du cultivar utilisé, *i.e.* Cabernet Sauvignon et Muscat d'Italie. Ce même type de résultat a également été constaté en fonction des traitements biologiques. Ainsi, seule la

microflore bactérienne des boutures de Cabernet Sauvignon co-inoculées par *N. parvum* et la combinaison B6+S5 était différente de celle des boutures inoculées par *N. parvum* seul. En revanche, la microflore fongique du même cépage inoculé par *N. parvum* seul était différente de celle ayant subi un traitement biologique par B6, S5 ou B6+S5. Pour le phytopathogène *P. chlamydospora,* la microflore fongique des boutures Cabernet Sauvignon et Muscat d'Italie inoculées par ce pathogène et la combinaison bactérienne B6+S5 était différente de celle des plants inoculés par le pathogène seul.

Il semble donc que les traitements biologiques, et principalement la combinaison bactrienne « B6+S5 », modifient la microflore bactérienne et/ou fongique indigène, ce qui favoriserait ainsi la protection de la plante contre les agressions dues à *N. parvum* et *P. chlamydospora.* Les mécanismes mis en jeu devront être élucidés lors d'expérimentations futures.

En conclusion, par rapport au traitement biologique des plants de vigne avec les souches B6 ou S5 seules, la combinaison de ces deux bactéries exerce un fort effet antagoniste qui permet de limiter les attaques dues à *N. parvum* et *P. chlamydospora* sur la vigne. De nouvelles études sur de telles combinaisons devraient être effectuées. Par ailleurs, étant donné que le criblage multi-cépage et multi-pathogène semble être le plus pertinent pour sélectionner des agents de biocontrôle potentiels contre les MDBs, cette démarche pourrait être recommandée lors de futurs essais.

Conclusion générale et perspectives

Les maladies du bois (MDBs) sont connues depuis l'Antiquité mais la phase d'acquisition de connaissances a longtemps était extrêmement limitée. Aujourd'hui, suite à la mobilisation internationale pour l'étude de ces maladies, des données clés en étiologie, épidémiologie, relations plante-hôte, etc, ont été obtenues (Lecomte et *al*., 2012 ; Bertsch et *al.*, 2013 ; Larignon et *al*., 2015). La plupart du temps, les MDBs apparaissent comme des phénomènes latents dont l'expression foliaires des symptômes est très variable selon les terroirs.

Parmi les MDBs, l'esca est la plus étudiée. Elle présente les caractéristiques d'une maladie de déséquilibre ou une « maladie-conséquence » à bien des égards. Faute de pouvoir proposer une solution phytosanitaire « miracle » comme a pu l'être l'arsénite de soude a une époque, la recherche de nouveaux moyens de lutte efficaces et respectueux de l'environnement contre l'esca s'impose (Lecomte et *al.*, 2008). Au regard de ces exigences, le biocontrôle présente des potentialités très intéressantes et actuellement un produit de ce type nommé Esquive, dont la matière active est un champignon antagoniste, *Trichodema atroviride*, a été homologué en 2013 contre l'eutypiose, puis contre l'esca en 2014. Les niveaux de protection sont cependant variables d'une année à l'autre et la recherche d'autres agents de biocontrôle est donc nécessaire.

Concernant l'esca, cette maladie constitue un sujet de préoccupation majeure pour les viticulteurs en Europe, Afrique du Sud, Amérique du Sud… car depuis l'interdiction d'utilisation de l'arsénite de sodium en 2001 à cause de sa toxicité sur l'environnement et l'être humain (Spinosi et *al*., 2008), la situation s'est aggravée et une progression régulière de cette maladie à l'échelle mondiale (Bertsch et *al*., 2013), dont la France (Bruez et *al.*, 2013) et la Tunisie (Ben ghnaya-Chakroun et *al.*, 2014 , Chebil et *al.*, 2014) est rapportée.

Actuellement, en Tunisie, les viticulteurs sont confrontés à deux problèmes majeurs : la méconnaissance des agents pathogènes responsables de l'esca et l'absence de méthodes de lutte efficaces.

Afin de mieux connaitre l'esca, la première partie de cette thèse a été consacrée à l'étude des symptômes de la forme lente et de la forme apoplectique dans la région nord de la Tunisie. Les espèces fongiques endophytes responsables de l'esca ont été isolées à partir des ceps présentant des symptômes foliaires de cette maladie.

La prospection de terrain réalisée durant l'été 2013 a révélé l'existence de l'esca dans les vignobles tunisiens, les symptômes étaient similaires à ceux décrits par plusieurs auteurs (Larignon et Dubos, 1997, Larignon et *al*., 2001, 2009 ; Valtaud et *al*., 2009) dans les vignobles français ou ceux d'autres pays viticoles de par la monde.

Une microflore fongique cultivable a été isolée à partir du bois nécrosé des ceps de vignes cv. Muscat d'Italie. L'identification moléculaire par amplification et séquençage des régions ITS

(White et *al.*, 1990; Chanderbali et *al.*, 2001) a permis d'assigner 12 souches saprophytes : *Alternaria* spp. *i.e. A. tenuissima, A. alternata* et *A. mali; Acremonium strictum*; *Fusarium lateritium*. Ces mêmes champignons ont été retrouvés antérieurement par d'autres chercheurs (Gerbore, 2009, Ben Ghnaya-Chakroun et *al.*, 2014) mais leur rôle au sein du bois de vigne est inconnu à ce jour.

Trois agents fongiques pathogènes *i.e. Lasidiodiplodia pseudotheobromae, Neofusicoccum parvum* et *Schizophyllum commune*, connus pour être impliqués, selon la littérature, dans les MDBs ont été isolés à partir du bois nécrosé de vigne dans la région nord de la Tunisie *i.e.* Mornag. Ce résultat confirme des études antérieures réalisées par notre équipe (BenGhanaya-Chakroun et *al.*, 2014), où deux agents pathogènes *.i.e. Diplodia seriata* et *Phomopsis viticola*, impliqués dans les MDBs avaient été identifiés dans les ceps provenant de la même région. Trois autres espèces fongiques *i.e. Botryosphaeria dothidea, Diplodia seriata* et *Neofusicoccum luteum* avaient également été isolées en 2014 par le groupe du Dr Chebil dans la région nord de la Tunisie. Ces résultats montrent que plusieurs ceps de vigne sont atteints par les MDBs dans cette région Tunisienne.

La présente thèse apporte cependant des éléments nouveaux sur ce thème. En effet, la biologie et le pouvoir pathogènes des 3 espèces fongiques, *L. pseudotheobromae*, *N. parvum* et *S. commune*, ont d'abord été étudiés avant de développer ultérieurement des moyens de lutte biologique, Ainsi, il a été montré que quatre mois après l'inoculation de jeunes plants par ces 3 pathogènes, *N. parvum* a induit des nécroses dont la longueur était la plus importante. Ce résultat confirme les études antérieures réalisées par Laveau et *al.* (2009) et Úrbez-Torres et Gubler, (2009), qui indiquaient que *N. parvum* était une espèce fongique très virulente au sein du complexe fongique responsable des MDBs.

Au sein du bois des ceps, à coté des agents fongiques, une microflore bactérienne endophytes abondante et diversifiée a été également détectée. Plusieurs études antérieures (Ferreira et *al.*, 1991; Schmidt et *al.*, 2001; Magnin-Robert et *al.*, 2007; Romero et *al.*, 2007; Trotel-Aziz et *al.*, 2006, 2008; Alfonzo et *al.*, 2008, 2009; Leelasuphakul et *al.*, 2008; Kotze et *al.*, 2011; Compant et *al.*, 2011, 2013; Haidar et *al.*, 2016) avaient montré que plusieurs bactéries colonisant les plantes avaient des propriétés d'agents de lutte biologique contre plusieurs maladies de la vigne. Dans ce contexte, il nous a paru judicieux dans la deuxième partie de ce travail, de se focaliser sur cette microflore isolée du bois des ceps de vigne afin de sélectionner de potentiels agents de biocontrôle biologique contre l'esca.

Soixante-neuf souches bactériennes ont ainsi été isolées à partir du bois de ceps plantés dans la région nord de la Tunisie. En se basant sur leurs critères morphologiques, 19 souches parmi les

plus abondantes ont été sélectionnées pour la suite de cette étude. L'identification moléculaire des souches par séquençage des gènes 16S et *rpoB* a permis d'identifier des *Bacillus* (12 souches), *Pantoea* (4 souches), *Pseudomonas* (2 souches) et *Curtobacterium* (1 souche). Certaines d'entre elles, non pathogènes de plantes, ont été prioritairement utilisées pour des tests ultérieurs de protection de la vigne contre l'esca.

La capacité de ces souches à exprimer des traits antagonistes a été recherchée. Les expérimentations ont consisté à sélectionner des souches qui possèdent des gènes codant pour des antibiotiques, qui produisent des sidérophores, solubilisent le phosphate, métabolisent différentes sources de carbone et inhibent la croissance mycélienne des pathogènes fongique *L. pseudotheobromae*, *N. parvum* et *S. commune* (essais réalisés avec les souches isolées des ceps tunisiens) *in vitro*. Ces expérimentations ont permis de choisir un agent de biocontrôle potentiel contre l'esca.

La souche B6 de *B. subtilis* a ainsi été sélectionnée en se basant principalement sur (i) la capacité de cette souche à posséder certains gènes codant pour des antibiotiques, *i.e.* fengycines A, B, D et E et une bacillomycine, ayant, selon la littérature, des propriétés fongitoxiques (Nishikori et *al.*, 1986 ; Hofemeister et *al.*, 2004 ; Koumoutsi et *al.*, 2004; Jourdan et *al.*, 2009) et à (ii) Inhiber la croissance mycélienne de trois espèces fongiques repertoriées ci-avant, Alfonzo et *al*. (2008), avaient précédemment montré qu'une souche de *B. subtilis* inhibait la croissance mycélienne *in vitro* de 3 autres champignons pathogènes impliqués dans l'esca, à savoir *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaemoniella chlamydospora* et *Fomitiporia mediterranea*. Les souches de cette espèce de bactérie, *B. subtilis*, semblent donc particulièrement intéressantes pour lutter contre l'esca.

Des essais de protection biologique *in planta* ont été réalisé dans la troisième partie de cette thèse via l'utilisation des antagonistes bactériens. L'originalité de notre expérimentation tient au fait (i) du choix de l'antagoniste biologique à appliquer, (ii) du cépage à traiter mais aussi (iii) à l'étude de l'effet de l'introduction d'un agent de biocontrôle dans les habitats cibles sur la microflore bactérienne et fongique indigène de la vigne.

Deux souches bactériennes naturellement présentes dans le bois nécrosé de ceps de vigne plantés en Tunisie, souche B6 de *B. subtilis*, et en France, souche S5 de *P. agglomerans* ont été utilisées pour protéger les plants des cépages Cabernet-Sauvignon et Muscat d'Italie contre les attaques de deux agents pathogènes *N. parvum* (isolé des ceps tunisiens) et *P. chlamydospora* (isolé de ceps français, Laveau et *al*. (2009)).

Un effet variétal a été observé puisque les souches des 2 espèces fongiques ainsi que les 2 souches bactériennes n'agissent pas de la même manière sur les deux cultivars utilisés. La souche

de *P. chlamydospora* a ainsi été plus agressive sur Cabernet Sauvignon par rapport au Muscat d'Italie. Concernant la protection assurée par les deux souches bactériennes, B6 de *B. subtilis* a été très efficace pour réduire les nécroses dues à *N. parvum* sur Muscat d'Italie. Pour la souche S5 de *P. agglomerans*, elle a été particulièrement intéressante pour inhiber la croissance mycélienne de *P. chlamydospora* sur Cabernet Sauvignon. Ce type de résultat peut être corrélé à la capacité de l'antagoniste biologique à coloniser et interférer avec la plante hôte. Mutawila et *al*. (2011) ont ainsi montré que l'effet protecteur de *Trichoderma* variait en fonction du cépage traité.

Il est important de noter que la combinaison bactérienne des deux souches B6 et S5 a été la plus efficace pour protéger les boutures de vignes des 2 cépages, Cabernet Sauvignon et Muscat d'Italie, contre les attaques par *N. parvum* et *P. chlamydospora*. Mutawila et *al*. (2011), avaient obtenus le même type de résultat. La combinaison de souches d'agents de biocontrôle est donc un point qu'il sera nécessaire d'approfondir dans le futur. Le choix des souches à combiner étant certainement un élément clé pour la réussite de la protection biologique.

Un effet variétal a été observé lors des analyses de la microflore globale indigène des ceps de vigne. Les Analyses en Composantes Principales (ACP) des profils SSCP montrent que les populations bactériennes et fongiques sont significativement différentes en fonction de cultivar utilisé *i.e.* Cabernet Sauvignon et Muscat d'Italie. De même, une perturbation de la microflore indigène bactérienne et/ou fongique des ceps de vignes Cabernet Sauvignon et/ou Muscat d'Italie a été montrée suite à l'introduction des agents bactériens antagonistes B6, S5 et/ou B6+S5 dans les plants de vignes. Il est probable que ces souches agissent directement contre les différents microorganismes qui colonisent le bois, ce qui pourrait influencer la communauté bactérienne et ou fongique et par conséquent la protection des ceps de vigne.

Pour la poursuite de ce travail, plusieurs pistes d'études et d'applications sont envisageables :

Au niveau des perspectives :

- Afin de compléter cette étude, il serait intéressant d'étudier ultérieurement le mode d'action des bactéries sélectionnées, comme l'effet qu'elles exercent sur la plante, *e.g.* l'induction de la résistance systémique du végétal, ou sur les autres microorganismes, *e.g.* la compétition pour les nutriments, l'espace ou le parasitisme.

- Afin de renforcer l'intérêt de l'utilisation de B6 de *B. subtilis* et S5 de *P. agglomerans* chez la vigne, il est important d'étudier leur effet sur la physiologie de cette plante : la photosynthèse, l'évapotranspiration, le transport d'assimilats, etc. La vigne étant une plante cultivée essentiellement pour faire du vin ou des jus, il serait judicieux de déterminer quel est l'effet de ces antagonistes bactériens sur la qualité des baies et par conséquent sur celle du vin et des jus de raisin.

- Un point clé pour un agent de biocontrôle est de connaître sa capacité à coloniser et à persister sur la plante qu'il est censé protéger. Les souches seront donc inoculées au vignoble afin d'apprécier leur aptitude à persister et à protéger les ceps dans les conditions environnementales réelles.

-Afin de rechercher d'autres agents de biocontrôle, il sera intéressant d'effectuer un échantillonnage plus important dans les régions Nord, Sud, Est et Ouest de la Tunisie. Cette étude permettrait également d'avoir une idée globale de la gravité et de la fréquence des MDBs dans les vignobles.

Références bibliographiques

Abdalla, M.A., Safie, M.H., El-Boghdady, M.M., Soltan, H.H.M. (2003). Fruit coating with certain plant oils for controlling post-harvest diseases of mangoes with special reference to stem end rot. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences,* 18:116-136.

Abd-El Ghani, H.S., Fatouh, H.M. (2005). First record of sugar beet root rot disease caused by *Botryodiplodia theobromae* in Egypt. *Egyptian Journal of Phytopathology,* 33(1) :107-108.

Abo-El-Dahab, M.K., El-Kazazz, S.A., Shoeib, A.A., El-Sheikh, M.A. (1992). Biochemical changes in citrus fruits infected with *Botryodiplodia theobromae*. *Mansoura University Journal of Agricultural Sciences,* 17:3525-3532.

Aït barka, E., Eullaffroy, P., Clément, C., Vernet, G. (2004). Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera L*. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reports Journal,* 22 : 608-614.

Alfonzo, A., Lo Piccolo, S., Conigliaro, G., Ventorino, V., Burruano, S., Moschetti, G. (2012). Antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 active against grapevine fungal pathogens. *Annals of Microbiology,* 62 : 1593-1599.

Alfonzo, A., Conigliaro, G., Torta, L., Burruano, S., Moschetti, G. (2009). Antagonism of *Bacillus subtilis* strain AG1 against vine wood fungal pathogens. *Phytopathologia Mediterranea,* 48 : 155-158**.**

Alfonzo, A., Ventorino, V., Torta, L., Burruano, S., Moschetti, G. (2008). *In vitro* antagonism of a grapevine endophytic *Bacillus subtilis* strain towards "esca" fungi. *Integrated Protection in Viticulture IOBC/wprs Bullettin,* 36 : 19-24.

Aloi, F., Reggiori, G., Bigot, A., Montermini, P., Bortolotti, R., Nannini, F., Osti, L., Mugnai L., Di Marco, S. (2015). REMEDIER® (*Trichoderma asperellum* and *Trichoderma gamsii*) : a new opportunity to control the esca disease complex. Five years of results of field trials in Italy. *Phytopathologia Mediterranea,* 54 (2) : 420-436.

Alvarez, F., Castro, M., Principe, A., Borioli, G., Fischer, S., Mori, G., Jofre, E. (2011). The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. *Journal of Applied Microbiology,* 112 : 159-174.

Amponsah, N.T., Jones, E.E., Ridgway, H.J., Jaspers, M.V. (2011). Identification, potential inoculums sources and pathogenicity of botryosphaeriaceous species associated with grapevine dieback disease in New Zealand. *European Journal of Plant Pathology,* 131: 467-482.

Amreen, T., Kumar, V.B.S. (2012). *In vitro* evaluation of native *Trichoderma harzianum* against major fungal pathogen of flower and fruit crops. *Environment and Ecology,* 30: 1039-1041.

Armengol, J., Vicent, A., Torné, L., García-Figueres, F., García-Jiménez, J. (2001). Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey. *Phytopathologia Mediterranea,* 40: 325-329.

Arnaud, G., Arnaud M. (1931). Traité de Pathologie Végétal. Encyclopédie Mycologique. Lechevalier, Paris 995 pages.

Auger, J., Esterio, M., Ricke, G., Pérez, I. (2004). Black dead arm and basal canker of *Vitis vinifera* cv. Red Globe caused by *Botryosphaeria obtusa* in Chile. *Plant Disease,* 88 : 1286.

Bartels, A. (1998). Guide des plantes de bassin méditerranéen. Eds Eugène Ulmer. Paris, 400 pages.

Baskarathevan, J., Marlene, Jaspers, V., Eirian Jones, E., Ridgway. H.J. (2011). Incidence and distribution of Botryosphaeriaceous species in New Zealand vineyards. *European Journal of Plant Pathology,* 132 (4) : 549-560.

Ben Ghnaya-Chakroun, A., Rezgui, A., Vallance, J., Kharoubi, I., Dridi, M., Hajlaoui, M.R., Rey, P., Sadfi-Zouaoui, N. (2014). First Molecular and Biochemical Characterization of *Phomopsis viticola* and *Diploidia seriata* two pathogens of Esca and black dead arm diseases of grapevine in the Northern region of the Tunisia. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3 (8):977-987.

Berger, A. (1989). Manuel de viticulture. Eds. Tec et Doc, Paris, 410 pages.

Berraf, A., Peros, J.P. (2005). Importance of Eutypa dieback and esca in Algeria and structure of the associated fungal community. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 39: 121-128.

Bertsch, 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. *Plant Pathology*, 62: 243-265.

Bester, W., Crous, P.W., Fourie, P.H. (2007). Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against Botryosphaeria species. Australian Plant Pathology, 36:73-77.

Billones, R.G., Ridgway, H.J., Jones, E.E., Jaspers, M.V. (2010). First Report of *Neofusicoccum macroclavatum* as a Canker Pathogen of Grapevine in New Zealand. *Plant Disease*, 94 (12): 1504.

Blouin-Bankhead, S., Landa, B.B., Lutton, E., Weller, D.M., McSpadden Gardener, B.B. (2004). Minimal changes in the rhizobacterial population structure following root colonization by wild type and transgenic biocontrol strains. *FEMS Microbiology Ecology*, 49: 307-318.

Boullard, B. (2001). Dictionnaire : Plantes médicinales du monde. Réalités et croyances. Paris, France : Eds. ESTEM, 636 pages. ISBN : 2843711177.

Briche E. (2011). Changement climatique dans le vignoble de Champagne: Modélisation thermique à plusieurs échelles spatio-temporelles (1950-2100). Université Paris Diderot -Paris 7 École doctorale: E.E.S.C."Économie, Espaces, Sociétés, Civilisations, 263 pages.

Brown-Rytlewski, D.E., McManus, P.S. (2000). Virulence of *Botryosphaeria dothidea* and *Botryosphaeria obtusa* on Apple and Management of Stem Cankers with Fungicides. Plant Disease, 84: 1031-1037.

Bruez, E., Haidar, R., T. Alou, M., Vallance, J., Bertsch, C., Mazet, F., Fermaud, M., Deschamps, A., Guerin-Dubrana, L., Compant, S., Rey, P. (2015). Bacteria in a wood fungal disease : Characterization of bacterial communities in wood tissues of esca-foliar symptomatic and asymptomatic grapevines. *Frontiers in Microbiology*, 6:1137.

Bruez, E., Vallance, J., Gerbore, J., Lecomte, P., Da Costa, J.-P., Guerin-Dubrana, L., Rey, P. (2014). Analyses of the Temporal Dynamics of Fungal Communities Colonizing the Healthy Wood Tissues of Esca Leaf-Symptomatic and Asymptomatic Vines. *PLoS ONE* 9, e95928.

Bruez, E. (2013). Etude comparative des communautés fongiques et bactériennes colonisant le bois de ceps de vigne ayant exprimé ou non des symptômes d'esca. Thèse de doctorat en Biologie végétale, Université de Bordeaux, France, 253 pages.

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

Burgess, T., Wingfield, M.J., Wingfield, B.D. (2003). Development and characterization of microsatellite loci for the tropical tree pathogen *Botryosphaeria rhodina*. *Molecular Ecology Notes*, 3 : 91-94.

Cabrefiga, J., Bonaterra, A., Montesinos, E. (2007). Mechanisms of antagonism of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. *International Microbiology*, 10 : 123-132.

Camporota, P. (1985). Antagonisme *in vitro* de *Trichoderma* spp. vis-à vis de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agronomy Journal*, 5 (7): 613-620.

Carter, M. V. (1957). *Eutypa armeniacae* Hansf. & Carter, sp. nov., an airborne vascular pathogen of Prunus armeniaca L. in southern Australia. *Australian Journal of Botany*, 5: 21-35.

Chabot, R., Antoun, H., Kloepper, J.W., Beauchamp, C.J. (1996a). Root colonization of maize and lettuce by bioluminiscent *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli. Applied and Environmental Microbiology*, 62 : 2767-2772.

Chabot, R., Hani, A., Cescas, P.M. (1996b). Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. phaseoli. *Plant and Soil*, 184 : 311-321.

Chabot, R., Antoun, H., Cescas, Michel, P. (1993). Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Canadian Journal of Microbiology*, 39 : 941-947.

Chanderbali, A.S., Van der Werff, H., Renner, S.S. (2001). Phylogeny and historical biogeography of Lauraceae: Evidence from the chloroplast and nuclear genomes. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 88: 104-134.

Chase, M.W., Reveal, J.L. (2009). A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 122-127.

Che, J., Liu, B., Ruan, C., Tang, J., Huang, D. (2015). Biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae*, which causes black spot disease of harvested wax apple fruit, using a strain of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX. *Crop Protection*, 67: 178-183.

Chebil, S., Fersi, R., Yacoub, A., Chenenaoui, S., Chattaoui, M., Melki, I., Zemni, H., Rhouma, A., Durante, G., Zacchi, E., Mliki, A. (2014). First report of *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata* and *Neofusicoccum lutueum* associated with canker and dieback of grapevines in Tunisia. *Plant Disease*, 98: 3-420.

Chen, C., Bock, C.H., Hotchkiss, M.H., Garbeletto, M.M., Cottrell, T.E. (2015). Observation and identification of wood decay fungi from the heartwood of peach tree limbs in central Georgia, USA. *European Journal of Plant Pathology*, 143:11-23.

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

Christen, D., Tharin, M., Perrin-Cherioux, S., Abou-Mansour, E., Tabacchi, R., Ve Deä Fago, G. (2005). Transformation of Eutypa Dieback and Esca Disease Pathogen Toxins by Antagonistic Fungal Strains Reveals a Second Detoxification Pathway Not Present in *Vitis vinifera. Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53 : 7043-7051.

Compant, S., Brader, G., Muzammil, S., Sessitsch, A., Lebrihi, A., Mathieu, F. (2013). Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. *Biological Control*, 58 :435-455.

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

Creaser, M.L, Wicks, T.J. (2004). Short-term effects of remedial surgery to restore productivity to *Eutypa lata* infected vines. *Phytopathologia Mediterranea,* 43: 105-107.

Cristinzio, G. (1978). Gravi attachi di Botryosphaeria obtuse su vite in provincial di Isernia. *Informatore fitopatologico,* 6: 21-23.

Crous, P.W., Gams, W. (2000). *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri Grapevine decline and esca. *Phytopathologia Mediterranea,* 39, 112-118.

Crous, P.W., Gams, W., Wingfield, M.J., van Wyk, P.S. (1996). Phaeoacremonium gen. nov. associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections. *Mycologia,* 88 : 786-796.

D'khili, B., Mouley, S. (2007). L'intégration économique de la filière vitivinicole dans le contexte de la réforme du modèle AOP en Tunisie (enjeux et perspectives du secteur coopératif). XXXème Congrès Mondial de la Vigne & du Vin. Vème Assemblée Générale de l'OIV Budapest (Hongrie), Juin 2007, pages : 1-7.

Dahmani, F. (2010). Les crus prennent de la bouteille, Jeune Afrique, p 50.

Dal, F. (2013). Manuel des pratiques viticoles contre les malaldies du bois. *SICAVAC et BIVC,* 113 pages.

Damm, U., Crous, P.W., Fourie, P.H. (2007). Botryosphaeriaceae as potential pathogens of Prunus species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia,* 99(5):664-680.

Darriet, P., Poupot, C., Armand, J.M., Dubourdieu, D., Clerjeau, M., Glories, Y., Bordeu, E., Pszczolkowski, P., Bugaret, Y. (2001). Incidence of vine sprayings with downy mildew fungicides, without parasitic fungi, on Cabernet Sauvignon grapes and wines composition. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin,* 35: 23-29.

Decoin, M. (2001). Grapevine products: news on withdrawals and restrictions. *Phytoma,* 543: 28-33.

Deliere, L., Miclot, A.S., Sauris, P., Rey, P., Calonnec, A. (2010). Efficacy of fungicides with various modes of action in controlling the early stages of an Erysiphe necator-induced epidemic. *Pest Management Science,* 66: 1367-1373.

DG/EDA. (2012). Direction Générale des Etudes et de Développement Agricoles, Ministère de l'agriculture et des ressources hydrauliques, Tunis, Tunisie.

Diab, M.M., Kahlil, I., Dawood, N.A., El-Assiuty, E.M. (1984). Ear and grain rot of maize caused by *Botryodiplodia theobromae* pathogens in Egypt. *Menofia Journal Of Agricultural Research,* 9:129-138.

Di Marco, S., Osti, F. (2007). Applications of *Trichoderma* to prevent *Phaeomoniella chlamydospora* infections in organic nurseries. *Phytopathologia Mediterranea,* 46 : 73-83.

Di Marco, S., Osti, F., Cesari, A. (2004). Experiments on the control of esca by Trichoderma. *Phytopathologia Mediterranea,* 43 : 108-115.

Di Marco, S. (2003). Experiments on the control of Esca by *Trichoderma*. *Phytopathologia Mediterranea,* 43 : 108-115.

Dissanayake, A.J., Zhang, W., Mei, L., Chukeatirote, E., Yan, J.Y., Li, X.H., Hyde, K.D. (2015). *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causes pedicel and peduncle discolouration of grapes in China. *Australasian Plant Disease Notes,* 10:21.

Donat, M.G., Peterson, T.C., Brunet, M., King, A. D., Almazroui, M., Kolli, R. K., Boucherf, D., Al-Mulla, A.Y., Nour, A.Y., Aly, A.A., Ali Nada, T.A., Semawi, M.M., Al Dashti, H.A., Salhab, T.G., El Fadli, K.I., Muftah, M.K., Dah Eida, S., Badi, W., Driouech, F., El Rhaz, K., Abubaker, M.J.Y., Ghulam, A.S., Sanhouri Erayah, A., Ben Mansour, M., Alabdouli, W.O., Al Dhanhaniw, J.S., Al Shekailiw. M.N. (2014). Changes in extreme temperature and precipitation in the Arab region : long-term trends and variability related to ENSO and NAO. *International Journal of Climatology,* 34: 581-592.

Dubos, B. (2002). Maladies cryptogamiques de la vigne. Champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne. Eds Ferret, Bordeaux. N° ISBN 2- 902416-77-6.

Dubos, B., Blancard, D., Boniface, J.C. (1980). L'eutypiose : un dépérissement de la vigne récemment identifié. *Phytoma,* 320: 13-15.

Duffy, B.K., Défago, G. (1999). Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Environmental Microbiology,* 65 : 2429-2438.

Edwards, J., Pascoe, I.G., Salib, S., Laukart, N. (2004). Hot water treatment of grapevine cuttings reduces incidence of Phaeomoniella chlamydospora in young vines. Phytopathologia Mediterranea, 43 : 158-159.

El-Goorani, M.A., El Meleigi, M.A. (1972). Dieback of grapevine by *Botryodiplodia theobromae Pat*. in Egypt. *Phytopathologia Mediterranea,* 11:210-211.

Espinoza, J. G., Briceño, E. X., Chávez, E. R., Úrbez-Torres, J. R., Latorre, B. A. (2009). *Neofusicoccum* spp. Associated with Stem Canker and Dieback of Blueberry in Chile. *Plant Disease,* 93 (11):1187-1194.

Ferreira, J.H.S., Matthee, F.N., Thomas, A.C. (1991). Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonist strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology,* 81 : 283-287.

Fischer, M. (2002). A new wood decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea. Mycological Progress* (1): 315-324.

Fourie, P.H., Halleen, F. (2006). Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. *European Journal of Plant Pathology,* 116:255-265.

Fourie, P.H., Halleen, F. (2005). Integrated strategies for proactive management of grapevine trunk diseases in nurseries. *Phytopathologia Mediterranea,* 44:111.

Fourie, P.H., Halleen, F. (2004). Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material. *Plant Disease,* 88: 1241-1245.

Fourie, P.H., Halleen, F., van der Vyver, J., Schreuder, W. (2001). Effect of *Trichoderma* treatments on the occurrence of decline pathogens in the roots and rootstocks of nursery grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 473-478.

Galet, P. (2000). Précis de viticulture. 7ème edition, Eds. JF. 597pages.

Galet, P. (1993). Précis de viticulture 6ème Ed. Déhan, Montpellier, 575 pages.

Geoffrion, R., Renaudin, I. (2002). Tailler contre l'esca de la vigne. *Phytoma,* 554 : 23-27.

Gerbore, J. (2013). Lutte biologique contre un champignon pathogène impliqué dans l'esca de la vigne par utilisation de l'oomycète Pythium oligandrum. Thèse de doctorat Sciences Agronomiques, Biotechnologies agro-alimentaires. Université de Pau, France, 251 pages.

Ghaffari, S., Ferchichi, A. (2011). Characterization of Tunisian Grapevine (Vitis vinifera L.) Cultivars Using Leaves Morphological Traits and Mineral Composition. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(5) : 6556-6563.

Giovanni, B., Sparapano, L. (2006). Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera L.*: III. Enzymes produced by the pathogens and their role in fungus-to-plant or in fungus-to-fungus interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 69: 182-194.

Goldstein, A.H. (1986). Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. *American Journal of Alternative Agriculture*, 1: 51-57.

Gramaje, D., Armengol, J. (2011). Fungal Trunk Pathogens in the Grapevine Propagation Process : Potential Inoculum Sources, Detection, Identification, and Management strategies. *Plant disease*, 95(9) : 1040-1055.

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

Haidar, R., Deschamps, A., Roudet, J., Calvo-Garrido, C., Bruez, E., Rey, P., Fermaud, M. (2016). Multi-organ screening of efficient bacterial control agents against two major pathogens of grapevine. *Biological Control*, 92: 55-65.

Halleen, F., Fourie, P.H., Lombard, P.J. (2010). Protection of grapevine pruning wounds against *Eutypa lata* by biological and chemical methods. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31: 125-132.

Hill, G.K. (1989). Effect of temperature on sporulation efficiency of oilspots caused by Plamopara viticola (Berk. Et Curt. Ex de Bary) Berl. Et de Toni in vineyards. *Viticulture and Enological Science* 44, 86-90.

Hofemeister, J., Conrad, B., Adler, B., Hofemeister, B., Feesche, J., Kucheryava, N., Steinborn, G., Franke, P., Grammel, N., Zwintscher, A., Leenders, F., Hitzeroth, G., Vater, J. (2004). Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptideand polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. *Molecular Genetics and Genomics*, 272 : 363-378.

Huglin, P. (1986). Biologie et Ecologie de la vigne. Ed. Payot Lausanne, Paris, 372 pages.

Iserin, P. (2001). Plantes médicinales. Eds. Larousse-Bordas. 283 pages.

Ismail, A.M., Cirvilleri, G., Polizzi, G., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Lombard, L. (2012). *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. *Australasian Plant Pathology*, 41:649-660.

Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E., Thonart, P. (1999). Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77 : 223-233.

John, S., Wicks, T.J., Hunt, J.S., Lorimer, M.F., Oakey, H., Scott, E.S. (2005). Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata* using *Trichoderma harzianum* and *Fusarium lateritium*. *Australasian Plant Pathology*, 34: 569-575.

Johnson, G.I., Cooke, T., Mead, A. (1993). Infection and quiescent of mango stem-end rot pathogens. *Acta Horticulturae*, 341:329-336.

Johnson, G.I, Cooke, A.W., Mead, A.J., Wells, I.A. (1991). Stem end-rot of mango in Australia: causes and control. *Acta Horticulturae*, 219:288- 295.

Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommes, J., Barthélemy, J.P., Thonart, P., Ongena, M. (2009). Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal,* 22 : 456-468.

Judd, W., Campbell, S., Christophe, S., Kellogo-Elizabeth, A., Steven, P. (2002). Botanique systématique une perspective physiologique. Traduction et revision scientifique de la 1ére édition Américaine par Jules. B et Charles. M.E.P, 223 pages.

Keller, M. (2010). The Science of Grapevines : Anatomy and Physiology. Academic Press, San Diego, 377 pages.

Kotze, C., van Niekerk, J.M., Mostert, L., Halleen, F., Fourie, P.H. (2011). Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathologia Mediterranea,* 50: 247-263.

Kotze, C., Van Niekerk, J., Halleen, F., Mostert, L., Fourie, P. (2001). Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathologia Mediterranea*, 50: 247-263.

Koumoutsi, A., Chen, X.H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., Borriss, R. (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing non ribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillusamyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology*, 186 : 1084-1096.

Kovács, C., Sándor, E., Peles, F. (2014). Analysis of mycelial growth rate and mycoparasitic ability of different *Trichoderma* isolates from grapevine trunks. *Analele Universităţii din Oradea, Fascicula Protecţia Mediului,* XXII : 13-20.

Kuntzmann, P., Barbe, J., Maumy-Bertrand, M., Bertrand, F. (2013). Late harvest as factor affecting esca and Botryosphaeria dieback prevalence of vineyards in the Alsace region of France. *Vitis,* 52 : 197-204.

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

Lafon, R. (1921). Modifications à apporter à la taille de la vigne dans les Charentes ; taille Guyot-Poussard, mixte et double ; l'apoplexie, traitement préventif et curatif. Pérignac, 95 pages.

Larignon, P., Spagnolo, A., Bertsch, C., Fontaine, F. (2015). First report of young grapevine decline caused by *Neofusicoccum parvum* in France. Plant Disease, 99 (12): 1859.

Larignon, P. (2012). Assessment of quality of plants in French grapevine nurseries with regard to fungi involved in wood diseases. In: ICGTD (International Council on Grapevine Trunk Disease) 8th International Workshop on Grapevine Trunk Disease. Valencia, Spain 18-21 June, 2012.

Larignon, P., Fontaine, F., Farine, A., Clément, C., Bertsch, C. (2009). Esca et black dead arm: deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la Vigne. *Comptes Rendus Biologies*, 332 : 765-783.

Larignon, P., Giansetto, K., Salancon, E., Berud, F., Girardon, K., Viguier, D., Jacquet, O. (2008). Effet de divers traitements à l'égard des champignons associés aux maladies du bois en pépinières. *Le pépiniériste,* 179 :10-17.

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 :14-19.

Larignon, P. (2005). Diseases of wood in Midi-Pyrenees: esca and BDA. The constitution of an international work group on the diseases of wood and the first results of experiments carried out in the laboratory and in nurseries. *Progres Agricole et Viticole,* 122(5) :103-106.

Larignon, P. (2004). Réflexions sur l'esca. *Phytoma,* 576:28-31.

Larignon, P., Dubos, B. (2001). Le Black Dead Arm : une maladie à ne pas confondre avec l'Esca. *Phytoma,* 538: 26-29.

Larignon, P., Fulchic, R., Cere, L., Dubos, B. (2001). Observations of Black Dead Arm in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea,* 40: 36-42.

Larignon, P., Fulchic, R. Céré, L ; Dubos, B. (2000). Le Black Dead Arm : une maladie à prendre au sérieux. Union girondine : 30-31.

Larignon, P., Dubos, B. (1997). Fungi associated with Esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology,* 3:147-157.

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

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

Lecomte, P., Darrieutort, G., Liminana, J. M., Louvet, G., Tandonnet, J.-P., Guerin-Dubrana, L., Goutouly, J.-P., Gaudillère, J.-P., Blancard, D. (2008). Eutypiose et esca II. Vers une gestion raisonnée des maladies de dépérissement. *Phytoma,* 616:37-41.

Lecomte, P., Louvet, G, Vacher, B., Guilbauld, P. (2006). Survival of fungi associated with grapevine decline in pruned wood after composting. *Phytopathologia Mediterranea,* 45:127-130.

Lecomte, P., Cardon, S., Bastien, N., GiryLaterriere, S. (2004). Risques d'infections par l'eutypiose au printemps. *Phytoma,* 576: 22-27.

Lee, J., Huh, N., Hong, J.H., Kim, B.S., Kim, G.H., Kim, J.J. (2012). The antagonistic properties of *Trichoderma spp*. inhabiting woods for potential biological control of wood-damaging fungi. *Holzforschung,* 66: 883-887.

Leelasuphakul, W., Hemmanee, P., Chuenchitt, S. (2008). Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology,* 48(1) : 113-121.

Lehoczky, J. (1974). Black dead arm disease of grapevine caused by Botryosphaeria stevensii infection. *Acta Phytopathologica Academia Scientiarum Hungrariacae,* 9(3-4) : 319-327.

Lepoivre, P. 2003. Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. Eds, Phytopathologie Lepoivre, France, p : 291, 313.

Levadoux, L. (1956). Les populations sauvages et cultivés de Vitis vinifera. Annales de l'amélioration des plantes, 118 pages.

Lewisohn, E., Gijzenand, M., Croteau, R.B. (1992). Regulation of monoterpene biosynthesis in conifer defense. *American Chemistry Society Symposium Series,* 497 : 8-17.

Limiñana, J.M., Pavreau, G., Boureau, F., Menard, E., David, S., Himonet, C., Fermaud, M., Goutouly, J.P., Lecomte, P., Dumot, V. (2009). Inner necrosis in a grapevine rootstock vineyard in the cognac area. *Phytopathologia Mediterranea,* 48:92-100.

Lin, G.H., Chen, C.L., Tschen, J.S.M., Tsay, S.S., Chang, Y.S., Liu, A.T. (1998). Molecular cloning and characterization of fengycin synthetase gene fen B from *Bacillus subtilis. Journal of Bacteriology,* 180 : 1338-1341.

Lugtenberg, B., Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology,* 63 :541-556.

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

Ma, Z., Boehm, E.W.A., Luo, Y., Michailides, T.J. (2001). Population structure of *Botryosphaeria dothidea* from pistachio and other hosts in California. *Phytopathology.* 91,665-672.

Magnin-Robert, M., Trotel-Aziz, P., Quantinet, D., Biagianti, S., Aziz, A. (2007). Biological control of *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated bacteria and stimulation of chitinase and b-1, 3 glucanase activities under field conditions. *European Journal of Plant Pathology,* 118:43-57.

Maher, N., Piot, J., Bastien, S., Vallance, J., Rey, P., Guerin-Dubrana, L. (2012). Wood necrosis in Esca-affected vines: types, relationships and possible links with foliar symptom expression. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin,* 46 : 15-27.

Marasco, R., Rolli, E., Fusi, M., Cherif, A., Abou-Hadid, A., El-Bahairy, U., Borin, S., Sorlini, C., Daffonchio, D. (2013). Plant growth promotion potential is equally represented in diverse grapevine root-associated bacterial communities from different biopedoclimatic environments. *BioMed Research International,* ID 491091 : 17 pages.

Marès, H. (1856). Mémoire sur la maladie de la vigne. *Bull. Soc. Agri.* De l'Hérault, 43e an. 165-321.

Michailides, T.J., Morgan, D.P., Doster, M.A. (1995). Diseases of pistachio in California and their significance. *ISHS Acta Horticulturae,* 419:56.

Mohamed, N., Lherminier, J., Farmer, M.J., Fromentin, J., Beno, N., Houot, V., Milat, M.L., Blein, J.P. (2007). Defense responses in grapevine leaves against *Botrytis cinerea* induced by application of a *Pythium oligandrum* strain or its elicitin, oligandrin, to roots. *Phytopathology,* 97: 611-620.

Morales, A., Latorre, B.A., Piontelli, E., Besoain, X. (2012). Botryosphaeriaceae species affecting table grape vineyards in Chile and cultivar susceptibility. *Ciencia e investigación agraria,* 39(3):445-458.

Moreau, C., Vinet, E. (1923). Contribution à l'étude de l'apoplexie de la vigne et de son traitement. *Progrès Agricole et Viticole,* 79: 87-89.

Mounier, E., Cortes, F., Cadious, M., Pajot, E. (2014). The benefits of *Trichoderma atroviride* I-1237 for the protection of grapevines against trunk diseases: from the nursery to the vineyard. *Phytopathologia Mediterranea,* 53: 591-592.

Mouria, B., Ouazzani-Touhami, A., Mouria, A., D, A. (2013). Mise en évidence d'une variation intra spécifique chez Botrytis cinerea et lutte biologique in vitro par l'extrait de compost. *Journal of Applied Biosciences* 64: 4797-4812.

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

Mutawila, C., Fourie, P.H., Halleen, F., Mostert, L. (2011). Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*, 50: S264-S276.

Nascimento, T., Rego, C., Oliveira, H. (2007). Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk diseases. *Phytopathologia Mediterranea*, 46: 218-224.

Ni, H.-F., Yang, H.-R., Chen, R.-S., Liou, R.-F., Hung, T.-H. (2012). New Botryosphaeriaceae fruit rot of mango in Taiwan: identification and pathogenicity. *Botanical Studies*, 53, 467-478.

Nishikori, T., Naganawa, H., Muraoka, Y., Aoyagi, T., Umezawa, D.H. (1986). Plipastatins; new inhibitors of phospholipase A2, produced by *Bacillus cereus* BMG302-fF67. III Structural elucidation of plipastatins. *The Journal of Antibiotics*, 39 : 755-761.

Octave, S., Amborabe, B.E., Luini, E., Ferreira, T., Fleurat-Lessard, P., Roblin, G. (2005). Antifungal effects of cysteine towards *Eutypa lata*, a pathogen of vineyards. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 1006-1013.

Phillips, A. J. L. (2002). Botryosphaeria species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*, 41: 3-18.

Pikovskaya, R.I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activities of some microbial species. *Microbiology*, 17 : 362-370.

Pinto, C., Pinho, D., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., Gomes, A.C. (2014). Unravelling the diversity of grapevine microbiome. *PLoS ONE*, 9 : e85622.

Pitt, W.M., Sosnowski, M.R., Taylor, A., Huang, R., Quirk, L., Hackett, S., Somers, A., Steel, C.C., Savocchia, S. (2010). Management of Botryosphaeria canker of grapevines. *Australian Viticulture*, 14:52-56.

Planchon, J. E. (1887). Monographie des Ampélidées vrais. Eds. In. A. F. P.P De Candolle and C. De Candolle. Monographiae Phaerogamarum 5(2). G. Masson, Paris, France, p: 305-654.

Ramarathnam, R., Bo, S., Chen, Y., Fernardo, W.G., Xuewen, G., De Kievit, T. (2007). Molecular and biochemical detection of fengycin and bacillomycin D-producing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. *Canadian Journal of Microbiology*, 53 : 901-911.

Ramos, L.J., Lara, S.P., McMillan, R.T., Narayanan, K.R. (1991). Tip die back of mango (Mangifera indica) caused by *Botryosphaeria ribis*. *Plant Disease*, 75:315-318.

Ravaz, L. (1919). Encore l'apoplexie de la vigne. *Progrès Agricole et Viticole*, 52 :601-603.

Ravaz, L. (1909). Sur l'apoplexie de la vigne. Progrès agricole et viticole, 30 : 547-579.

Ravaz, L. (1898). Sur le folletage. *Revue de Viticulture*, 10 : 184-186.

Redford, A.J., Bowers, R.M., Knight, R., Linhart, Y., Fierer, N. (2010). The ecology of the phyllosphere : geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environmental Microbiology*, 12 : 2885-2893.

Ren, H., Lu, L.M., Soejima, A., Luke, Q., Zhang, D.X., Chen, Z.D., Wen, J. (2011). Phylogenetic analysis of the grape family (Vitaceae) based on the noncoding plastid trnC-petN, trnH-psbA, and trnL-F sequences. *Taxon*, 60 (3) : 629-637.

Renault, D., Deniel, F., Benizri, E., Sohier, D., Barbier, G., Rey, P. (2007). Characterization of *Bacillus* and *Pseudomonas* strains with suppressive traits isolated from tomato hydroponic-slow filtration unit. *Canadian Journal of Microbiology*, 53 : 784-797.

Reynier, A. (2003). Manuel de viticulture. 9éme édition. Eds. Tec & doc. France. 548 pages.

Reynier, A. (1991). Manuel de viticulture technique et documentation. Eds. J.B Bailliére. Paris 6 éme edition, 411 pages. ISBN 2-85206-775-7 br. Paris.

Rezgui, A., Ben Ghnaya-Chakroun, A., Vallance, J., Bruez, E., Hajlaoui, M.R., Sadfi-Zouaoui, N., Rey, P. (2016). Endophytic bacteria with antagonistic traits inhabit the wood tissues of grapevines from Tunisian vineyards. *Biological Control*, 99 : 28-37.

Rodriguez, H., Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17 : 319-339.

Rolli, E., Marasco, R., Vigani, G., Ettoumi, B., Mapelli, F., Deangelis, M.L., Gandolfi, C., Casati, E., Previtali, F., Gerbino, R., Pierotti Cei, F., Borin, S., Sorlini, C., Zocchi, G., Daffonchio, D. (2015). Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. *Environmental Microbiology*, 17 (2) : 316-331.

Rolshausen, P.E., Urbez-Torres, J.R., Rooney-Latham, S., Eskalen, A., Smith, R.J., Gubler, W.D. (2010). Evaluation of Pruning Wound Susceptibility and Protection Against Fungi Associated with Grapevine Trunk Diseases. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61:113-119.

Rolshausen, F.P., Trouillas, F., Gubler, W.D. (2004). Identification of *Eutypa lata* by PCR-RFLP. *Plant Disease*, 88 (9): 925-929.

Romero, D., De Vincente, A., Rakotoaly, R.H., Dufour, S.E., Veening, J.W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P., Paquot, M., Pérez-García, A. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* towards *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 20(4) : 430-440.

Rousseau, J., Blanc, D., Jacus, V. (2008). Influence de l'oïdium: sur le rendement et la qualité des raisins et des vins. *Phytoma*, 615 : 37-41.

Rovesti, L., Montermini, A. (1987). A grapevine decline caused by Shaeropsis malorum widespread in the provence of reggio Emilia. *Informatone Fitopatologico*, 37 : 51-59.

Rumbos, I.C. (1993). Dieback symptoms on olive trees caused by the fungus *Eutypa lata*. *EPPO Bulletin*, 23: 441-445.

Sadfi-Zouaoui, N., Essghaier, B., Hajlaoui, M.R., Fardeau, M.L., Cayol, J.L., Ollivier, B., Boudabous, A. (2008). Ability of moderately halophilic bacteria to control grey mould disease on tomato fruits. *Journal of Phytopathology*, 156 : 42-52.

Samaali, B.M. (2012). Etiologie de la maladie du court-noué dans les principales régions viticoles de la Tunisie. Mastère, à l'Institut National Agronomique de Tunisie : département de Protection des Plantes et Maladies Post-récoltes, 73 pages.

Sánchez, M. E., Venegas, J., Romero, M. A., Phillips, A. J. L., Trapero, A. (2003). Botryosphaeria and related taxa causing oak canker in southwestern Spain. *Plant Disease*, 87:1515- 1521.

Savocchia, S., Steel, C.C., Stodart, B.J., Somers, A. (2007). Pathogenicity of Botryosphaeria species isolated from declining grapevines in sub tropical regions of Eastern Australia. *Vitis*, 46:27-32.

Scherwinski, K., Grosch, R., Berg, G. (2008). Effect of bacterial antagonists on lettuce: active biocontrol of *Rhizoctonia solani* and negligible, short-term effects on nontarget microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology*, 64 : 106-116.

Schmidt, C.S., Lorenz, D., Wolf, G.A. (2001). Biological control of the grapevine dieback fungus *Eutypa lata* I: Screening of bacterial antagonists. *Journal of Phytopathology*, 149: 427-435.

Schultz, H.R. (1992). An empirical model for the stimulation of leaf appearance and leaf area development of primary shoots of several grapevines (Vitis vinifera L.) canopy-systems. *Scientia Horticulturae*, 52 : 179-200.

Schwyn, B., Neilands, J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1): 47-56.

Schweinitz, L.D. (1832). Synopsis Fungorum in America Boreali media degentium. Secundum Observationes. *American Philosophical Society*, 4 : 141-316.

Shoemaker, R.A. (1964). Conidial states of some Botryosphaeria species on Vitis and Quercus. *Canadian Journal of Botany*, 42: 1297-1301.

Simon, J.L., Eggenberger, W., Koblet, W., Mischler, M., Schwarzenbach, J. (1992). Viticulture. Ed. Payot, Lausanne/Paris. ISBN 10: 260103114X / ISBN 13: 9782601031140.

Simon, J.L., Schwarzenbach, J., Mischler, M., Eggenberger, W., Koblet, W. (1977). Viticulture. Ed. Payot, Lausanne. ISBN 2-601-00376-6. 195 pages.

Smith, H., Crous, P.W., Wingfield, M.J., Coutinho, T.A., Wingfield, B.D. (2001). Botryosphaeria eucalyptorum sp. nov., a new species in the *B. dothidea*-complex on Eucalyptus in South Africa. *Mycologia*, 93(2):277-285.

Sosnowski, M.R., Creaser, M.L., Wicks, T.J., Lardner, R., Scott, E.S. (2008). Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 14:134-142.

Sparapano, L., Bruno, G., Campanella, A. (2001a). Interactions between associated fungi with esca of grapevine, and their secondary metabolites. *Phytopathologia Mediterranea*, 40:417-22.

Sparapano, L., Bruno, G., Graniti, A. (2001b). Three-year observation of grapevines cross-inoculated with esca-associated fungi. *Phytopathologia Mediterranea*, 40 :S376-S386.

Sparapano, L., Bruno, G., Ciccarone, C., Graniti, A. (2000). Infection of grapevines by some fungi associated with esca. I. *Fomitiporia punctata* as a wood-rot inducer. *Phytopathologia Mediterranea*, 39:46-52.

Spinosi, J., Fevotte, J., Vial, G. (2008). Eléments techniques sur l'exposition professionnelle aux pesticides arsenicaux. Matrice cultures-expositions aux pesticides arsenicaux. *Institut de veille sanitaire*, 22 pages. ISBN-NET: 978-2-11-098459-3.

Surico, G., Mugnai, L., Marchi, G. (2006). Older and more recent observations on esca: a critical review. *Phytopathologia Mediterranea*, 45 :S68-S86.

Sutton, .J.C. (1995). Evolution of micro-organisms for biocontrol/Botrytis cinerea and strawberry, a case study. *Advances in plant Pathology*, 11: 173-190.

Takenaka, S., Nakamura, Y., Kono, T., Sekiguchi, H., Masunaka, A., Takahashi, H. (2006). Novel elicitin-like proteins isolated from the cell wall of the biocontrol agent *Pythium oligandrum* induce defence-related genes in sugar beet. *Molocular Plant Pathology*, 7 : 325-339.

Taylor, A., Hardy, G.E., Wood, P., Burgess, T. (2005). Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine decline in Western Australia. *Australian Plant Pathology*, 34:187-195.

Teoh, Y.P., Mat Don, M. (2015). Effect of Temperature on *Schizophyllum commune* Growth and 4H-pyran-4-one, 2,3-dihydro-3, 5-dihydroxy-6-methyl- Production using a Bubble Column Bioreactor. *Chiang Mai Journal of Science,* 42(3): 539-548.

Thiéry D., Rey P., Delière L., Calonnec A., Lecomte P., Cartolaro P., Fermaud M., Guérin L., Blancard D., Van Helden M., Louvet G., Corio-Costet M.F., Papura D., Schneider C., Merdinoglu-Weideman S., Mestre P., Prado E., Merdinoglu D. (2007). Démarches innovantes pour une protection durable du vignoble. *Innovations Agronomiques,* 1:75-94.

Thomidis, T., Michailides, T.J., Exadaktylou, E. (2011). *Neofusicoccum parvum* associated with fruit rot and shoot blight of peaches in Greece. *European Journal of Plant Pathology,* 131: 661-668.

Tovar Pedraza, J.M., Mora Aguilera, J.A., Nava Diaz, C., Teliz Ortiz, D., Villegas Monter, A., Leyva Mir, S.G. (2013). Control of *Lasiodiplodia theobromae,* the causal agent of dieback of sapote mamey [Pouteria sapota (Jacq.) H. E. Moore and Steam] grafts in Mexico. Revista Fitotecnia Mexicana, 36: 233-238.

Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Biagianti, S., Aziz, A. (2008). Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. Mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. *Environmental and Experimental Botany,* 64 : 21-32.

Tuao Gava, C.A., Leal Menezes, M.E. (2012). Efficiency of *Trichoderma spp* isolates on the control of soil-borne pathogens in the yellow melon. *Revista Ciencia Agronomica,* 43: 633-640.

Úrbez-Torres, J. R.; Peduto, F., Vossen, P. M., Krueger, W. H., Gubler, W. D. (2013). Olive Twig and Branch Dieback: Etiology, Incidence, and Distribution in California. *Plant Disease,* 97 (2): 231- 244.

Úrbez-Torres, J.R., Peduto, F., Striegler, R.K., Urrea-Romero, K.E., Rupe, J.C., Cartwright, R.D., Gubler, W.D. (2012). Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk disease in Arkansas and Missouri. *Fungal Diversity,* 52 (1):169-189.

Úrbez-Torres, J.R., Rooney-Latham, S., Gubler, W.D. (2010 a). First Report of *Diplodia corticola* causing Grapevine (*Vitis vinifera*) Cankers and Trunk Cankers and Dieback of Canyon Live Oak (Quercus chrysolepis) in California. *Plant Disease*, 94:785.

Úrbez-Torres, J.R., Battany, M., Bettiga, L.J. (2010b). Botryosphaeriaceae species spore trapping studies in California vineyards. *American Phytopathological Society*, 94:717-724.

Úrbez-Torres, J.R., Gubler, W.D. (2009). Pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* Species Isolated from Grapevine Cankers in California. *Plant Disease,* 93: 584-592.

Úrbez-Torres, J.R., Leavitt, G.M., Guerrero, J.C., Guevara, J., Striegler, K., Allen, A. (2007a). Identification of fungal pathogens associated with grapevine cankers in the main grape-growing areas of the United States and Mexico. *Phytopathologia Mediterranea*, 46:109-110.

Úrbez-Torres, J.R., Luque, J., Gubler, W.D. (2007b). First report of *Botryosphaeria iberica* and *B. viticola* associated with grapevine decline in California. Plant Disease, 91:772.

Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Voegel, T. M., Gubler, W. D. (2006a). Identification and distribution of Botryosphaeria spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease*, 90(12): 1490-1503.

Valtaud, C., Larignon, P., Roblin, G., Fleurat-Lessard, P. (2009). Developmental and ultrastructural features of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeacremonium aleophylum*in relationship with the capacity with xylem degradation in esca disease of grapevine. *Journal of Plant Pathology,* 91 (1):37-51.

Van Niekerk, J.M., Crous, P.W., Groenewald, J.Z.E., Fourie, P.H., Halleen, F. (2004). DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia,* 96:781-798.

Viala, P. (1926). Recherches sur les maladies de la vigne Esca. *Annal Epiphyt fasc* 1 :1-108.

Viret, O., Gindro, K. (2014). La Vigne. Maladies fongiques (1), 255 pages. ISBN 978-3-85928-097-7.

Wenneker, M., Vink, P., Van Bruggen, A.S. (2006). Eutypa dieback as an important (new) disease in red currant (Ribes rubrum) in The Netherlands. *Communications in agricultural and applied biological sciences,* 71: 881-885.

West, E.R., Cother, E.J., Steel, C.G., Ash, G.J. (2010). The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. *Canadian Journal of Microbiology,* 56 : 209-216.

White, T.J., Birns, T., Lee, S., Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press. Eds, A Guide to Methods and Applications, New York, 315-322.

Whipps, J.M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany,* 52 : 487-511.

Whips, J.M. (1987). Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytologist,* 107: 127-142.

Yacoub, A., Gerbore, J., Magnin, N., Chambon, P., Dufour, M.C., Corio-Costet, M.F., Guyoneaud, R., Rey, P. (2016). Ability of *Pythium oligandrum* strains to protect *Vitis vinifera L.,* by inducing plant resistance against *Phaeomoniella chlamydospora,* a pathogen involved in Esca, a grapevine trunk disease. *Biological control,* 92 :7-16.

Yan, J.Y., Xie, Y., Zhang, W., Wang, Y., Liu, J.K., Hyde, K.D., Seem, R.C., Zhang, G.Z., Wang, Z.Y., Yao, S.W., Bai, X.J., Dissanayake, A.J., Peng, Y.L., Li, X.H. (2013). Species of Botryosphaeriaceae involved in grapevine dieback in China. *Fungal Diversity,* 61:221-236.

Yan, J.Y., Xie, Y., Yao, S.W., Wang, Z.Y., Li, X.H. (2012). Characterization of *Botryosphaeria dothidea,* the causal agent of grapevine canker in China. *Australian Plant Pathology,* 41(4): 351-357.

Yan, J.Y., Li, X.H., Kong, F.F., Wang, Z.Y., Gong, L.Z., He, H.P. (2011a). Occurrence of grapevine trunk disease caused by *Botryosphaeria rhodina* in China. *Plant Disease*. 95:2-219.

Yan, J.Y., Peng, Y.L., Xie, Y., Li, X.H., Yao, S.W., Tang, M.L., Wang, Z.Y. (2011b). First Report of Grapevine Trunk Disease Caused by *Botryosphaeria obtusa* in China. Plant Disease, 95:616.

Zoghlami, N., Riahi, L., Laucou, V., Lacombe, T., Mliki, A., Ghorbel, A., This, P. (2009). Origin and genetic diversity of Tunisian grapes as revealed by microsatellite markers. Scientia Horticulturae, 120 : 479-486.

Zoghlami, N., Mliki, A., Ghgorbel, A. (2001). Evaluation of genetic diversity among Tunisian grapevines by RAPD markers. *Vitis* 40(1) : 31-37.

Webographie

Ephytia, INRA : http://ephytia.inra.fr/fr/P/97/Vigne

Fig. 9 (p20) : http://ephytia.inra.fr/fr/C/6966/Vigne-Principaux-symptomes

Fig. 10 (p22) : http://ephytia.inra.fr/fr/C/6968/Vigne-Principaux-symptomes

Fig. 11 (p23) : http://ephytia.inra.fr/fr/C/6979/Vigne-Principaux-symptomes

Fig. 12 (p27) : http://ephytia.inra.fr/fr/C/6969/Vigne-Principaux-symptomes

Fig.14 (p30) : http://ephytia.inra.fr/fr/C/6976/Vigne-Principaux-symptomes

Luc Poulain d'Andecy, 2012

Fig 7A (p15) :http://oenotourisme-tunisie.blogspot.fr/2012/07/la-route-des-vins-les-vignerons-de.html

OIV : http://www.oiv.int/

Fig. 6 (p13) : http://www.oiv.int/public/medias/177/statistiques-mainz-congress-2015-oiv-en.pdf

Valorisation des résultats
Publication

Endophytic bacteria with antagonistic traits inhabit the wood tissues of grapevines from Tunisian vineyards

(Acceptée dans la revue Biological Control (2016))

A. Rezgui[a,b,c], A. Ben Ghnaya-Chakroun[a], J. Vallance[b,c], E. Bruez[b,c], M. R. Hajlaoui[d], N. Sadfi-Zouaoui[a], P. Rey[b,c]

[a] Laboratoire Microorganismes et Biomolécules Actives, Faculté des Sciences de Tunis, Université de Tunis El Manar, 2092 Tunisie.

[b] INRA, UMR1065 Santé et Agro-écologie du Vignoble (SAVE), ISVV, 33140 Villenave d'Ornon, France.

[c] Université de Bordeaux, Bordeaux Sciences Agro, UMR1065 SAVE, 33140 Villenave d'Ornon, France.

[d] INRAT, Laboratoire de Biotechnologie appliquée à l'agriculture, Ariana, 2092 Tunisie.

Corresponding author: Patrice Rey (e-mail: patrice.rey@agro-bordeaux.fr)

Abstract

Vineyards throughout the world, including Tunisia, are being attacked by Grapevine Trunk Diseases (GTDs) such as Esca and Botryosphaeriae dieback. In this study, the bacterial microflora colonizing the non-necrotic and necrotic wood tissues of Tunisian mature grapevines (cv Muscat d'Italie) was investigated. Both types of tissues were studied in order to decipher microbial communities associated with them and to find a suitable BCA that can be applied to the Tunisian terroir. Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) analyses showed that complex bacterial communities specifically colonized both types of wood tissues. The 19 most abundant cultivable strains, selected on their morphology, were isolated from plant samples and assigned to *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Curtobacterium* and *Bacillus* species based on the 16S rRNA and *rpo*B genes. Biochemical and microbiological screenings revealed that those 19 strains (i) metabolized differently carbon sources, even within the same species, (ii) possessed antibiotic genes, (iii) produced siderophores and solubilized phosphates and (iv) had an *in vitro* antagonistic effect against 3 fungal pathogens (*Lasidiodiplodia pseudotheobromae*, *Neofusicoccum parvum* and *Schizophyllum commune*) involved in GTDs. One strain, *Bacillus subtilis* "B6", had a positive effect on young vines of a cultivar, Muscat d'Italie, frequently planted in Tunisia, by reducing the size of the wood necrosis caused by *N. parvum*, showing its potential to counteract infection caused by this GTDs agent.

Keywords: Bacterial communities, Grapevine Trunk Diseases, Plant protection, SSCP, Wood necrosis.

1. Introduction

Plants, like many other organisms, are colonized by bacteria inside or around them (Sessitsch et al., 2002; Berg et al., 2005; Compant et al., 2010). They colonize various plant tissues and organs: roots, leaves, flower clusters, seeds and fruits (Gray and Smith, 2005; Martins et al., 2013) and have been described as inhabitants of specific microenvironments of the phyllosphere, rhizosphere or other parts of the phytosphere, and the plant endosphere (James et al., 2002; Compant et al., 2010). Those microorganisms can be endophytic (Compant et al., 2011) as they are able to live inside plants tissues without causing diseases to their host (Iniguez et al., 2005). Via the vascular system they can move into plants from roots to leaves, flowers and fruits (Hardoim et al., 2008; Compant et al., 2011). Those bacteria have many important beneficial roles in the metabolism and physiology of the host plant. They can *i)* stimulate the growth of plants by synthesizing plant growth hormones or enzymes (Hardoim et al., 2008; Bulgari et al., 2009; Compant et al., 2010, 2011; West et al., 2010); *ii)* promote resistance of plants by inducing host-defense mechanisms (Iniguez et al., 2005; Miché et al., 2006; Rosenblueth and Martínez-Romero, 2006); *iii)* control diseases by suppressing pathogens (Whipps, 2001) and/or *iv)* solubilizing phosphates (Whipps, 2001; Hurek and Reinhold-Hurek, 2003) and producing siderophores (O'Sullivan and Gara, 1992).

Bacteria have been isolated from many crops, among which sugar beet, cotton (Misaghi and Donndelinger, 1990), rice, soybean (Kuklinsky-Sobral et al., 2005), cucumber, potato and tomato (Sessitsch et al., 2005). They were also demonstrated to colonize the root system, phyllosphere and wood tissues of grapevine, *Vitis vinifera* (Compant et al., 2005*a*, 2005*b*, 2008*a*, 2011; Trotel-Aziz et al., 2008; West et al., 2010; Alfonzo et al., 2012; Marasco et al., 2013; Pinto et al., 2014; Bruez et al., 2015). Studies on bacteria inhabiting the wood tissues of grapevine were recently carried out by our group (Bruez et al., 2015; Haidar et al., 2016) but as many pieces of information are still lacking, our objective was thus to study for the first time, the bacterial microflora colonizing the wood of Tunisian mature grapevines and to select potential antagonistic strains against three fungal pathogens involved in two major Grapevine Trunk Diseases (GTDs), *i.e*. Esca and Botryosphaeriae dieback. Two fungi, *Lasidiodiplodia pseudotheobromae* and *Schizophyllum commune*, are involved in Esca and one, *Neofusicoccum parvum*, is involved in Botryosphaeriae dieback. These GTDs affect the wood of grapevines and subsequently lead to plant death (Bertsch et al., 2013). They have become, over the last two decades, a subject of major concern for the wine industry in France (Bruez et al., 2013) and in

many countries (Bertsch et al., 2013). For instance, besides reducing the plant life span, GTDs have also a negative impact on wine quality as demonstrated by Lorrain et al. (2012).

In that context, this study was conducted in order to investigate bacterial microflora associated with non-necrotic and necrotic wood tissues of mature Tunisian grapevines that showed external GTDs-foliar symptoms. Bacteria were, selected and screened for their potential to act as BCA. Different approaches were used: (i) the genetic structure of the bacterial communities was studied using the fingerprinting method, Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP). (ii) From these bacterial communities, bacterial strains within both types of wood tissues were isolated and identified by sequencing the 16S rRNA and *rpo*B genes. (iii) The abilities of the selected bacteria in terms of control of plant pathogens: detection of antibiotics genes (4 fengycins coded A, B, D and E; 1 bacillomycin), degradation of different sole-carbon sources, production of siderophores and phosphate solubilization, and *in vitro* confrontations against three GTDs plant pathogenic fungi, *i.e. L. pseudotheobromae*, *N. parvum* and *S. commune*, were tested. One bacterial strain was then selected for an *in planta* assay on young vine of Muscat d'Italie, a cultivar frequently planted in Tunisia, to test its ability to reduce the development of wood necrosis caused by *N. parvum*.

2. Material and methods

2.1. Plant material and sampling

In order to study the bacterial microflora inhabiting the wood tissues of Tunisian grapevines, a sampling was carried out in summer 2013 in four vineyards (Fig. 1A) located in the North of Tunisia. These vineyards consisted of mature vines (15 to 17-year old plants) of a table grape cultivar, Muscat d'Italie, grafted on rootstock P1103 and trellised as single vines on a pergola system (Fig. 1B). They were irrigated with a drip irrigation system and covered by nets (Fig. 1C) to protect the plants from hail.

Cordons were randomly collected from 10 mature vines that showed external GTDs-foliar symptoms in the four vineyards surveyed and cut longitudinally with an electric saw. From the inner part of each cordon, wood samples were taken from necrotic and/or from non-necrotic (apparently healthy) tissues, cut and stored before being processed for downstream analyses. For each wood tissues collected, the samples consisted of wood chips (around 5 mm in length) for microbiological analyses and approximately 5 g of tissue for molecular ones.

2.2. Analysis of the microbial communities colonizing the woody tissues by Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

SSCP analyses of the bacterial communities were performed on the 30 wood samples taken from the vine cordons collected in Tunisia in summer 2013 *i.e.* 12 necrotic (NW), 12 non-necrotic (HW) and 6 cordon ends (CE: thin cordon that can't be cut longitudinally to determine the type of wood). All the wood samples were ground in liquid nitrogen with a TissueLyserII (Qiagen) and kept at -80 °C prior to DNA extraction.

DNA was extracted from 60-mg aliquots of woody tissues with the Indvisorb Spin Plant mini Kit (Invitek) according to the manufacturer's instructions. The DNA extracts were then quantified with a nanodrop (ND-1000, Thermoscientific, Labtech) and homogenized at a concentration of 10 ng μL^{-1}.

A pair of primers recognizing the V5-V6 region of the 16S rRNA gene (799f/1115r) was used (Table 1). DNA was amplified by PCR in an Epgradient Mastercycler (Eppendorf) in a reaction mixture (25 µL final volume) consisting of 1 µL of DNA template (10 ng μL^{-1}), 2.5 µL of 10X Pfu buffer (Agilent Technologies), 1 µL of dNTP (10 mM), 0.5 µL of each primer (20 µM), 2.5 µL of BSA (10 µg μL^{-1}) (New England BioLabs), 0.5 µL of Pfu Turbo (Agilent Technologies) and 16.5 µL of sterile distilled water. The cycling conditions were as follows:

enzyme activation at 95 °C for 2 min; 25 cycles of denaturation at 95 °C for 45 s, hybridization at 54 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 1 min; and a final extension at 72 °C for 10 min. The PCR products were visualized by 2% TBE agarose gel electrophoresis prior to SSCP analysis.

SSCP analyses were performed on an ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) equipped with four 36-cm long capillaries. One microliter of a PCR product was mixed with 18.8 µL formamide Hi-Di (Applied Biosystems) and 0.2 µL standard internal DNA molecular weight marker Genescan 400 HD ROX (Applied Biosystems). The sample mixture was denatured at 95 °C for 5 min and immediately cooled on ice, and then loaded onto the instrument. The non-denaturing polymer consisted of 5.6% POP conformational analysis polymer (Applied Biosystems), 10% glycerol, EDTA buffer 10x (Applied Biosystems) and water. The migration time was set to 2000 s, the voltage to 15 kV and the temperature was 32°C.

Samples were co-migrated with the fluorescent size standard (Genescan-400 ROX) to allow comparison of migration profiles between samples. Patterns were aligned with StatFingerprints (version 2.0) and studied by Principal Components Analyses with R (version 3.1.3.). In the Vegan R-Package, the Anosim test using Bray-Curtis distance was employed to compare the data.

2.3. Isolation of bacteria from the wood tissues of mature grapevines

For each of the 10 vine cordons collected, 15 chips (around 5 mm in length) of wood tissues were randomly sampled. The wood fragments were surface disinfected by immersion in 70% ethanol for 1 min followed by 2.5% calcium hypochlorite solution for 3 min. Then, the samples were rinsed 3 times in sterile distilled water, dried on a sterile filter paper and 15 sterilized chips were plated onto R2A agar (Sigma) amended with 100 $mg.L^{-1}$ cycloheximide (Sigma) for 48 hours at 27 °C.

Sixty-nine bacterial strains were recovered from the 150 wood pieces collected. The 19 most abundant were selected based on morphological differences, subsequently purified onto R2A agar (Sigma) and characterized by using three biochemical tests following the standard procedures: *i)* Gram staining, *ii)* the catalase and *iii)* oxidase activities, before being maintained on cryogenic storage beads (Cryosystème Protect, Dutscher) at -20 °C.

2.4. Identification of bacteria by sequencing the 16S rRNA and rpoB genes

Genomic DNA from the 19 selected bacterial strains was extracted from pure cultures grown in TSB (Tryptone Soy Broth, Conda) by using the commercial kit Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitek) according to the manufacturer's instructions. The DNA extracts were then quantified with a nanodrop (ND-1000, Thermoscientific, Labtech) and homogenized at a concentration of 20 ng μL^{-1}.

DNA samples were sent to Beckman Coulter Genomics (Takeley, United Kingdom) for sequencing the 16S rRNA and *rpo*B genes, respectively with the primers 799f and 1429r, and rpoBf and rpoBr (Table 1). For species level identification, sequences were compared with the GenBank database by using the Blastn program (Altschul et al., 1997).

The 16S rRNA and *rpo*B sequences are available at the GenBank database respectively under accession numbers KT350548 to KT350554.

2.5. Detection of antibiotic genes in the bacterial strains

The 19 selected bacterial strains were screened for the production of lipopeptide (LP) antibiotics by using specific primers that amplify genes from the fengycin and iturin families. Four genes of 4 fengycin (A, B, D and E) and 1 of iturin (a bacillomycin gene) (Lin et al., 1998; Ramarathnam et al., 2007; Alvarez et al., 2011) were searched for. PCR assays were performed in a Mastercycler Gradient Thermocycler (Eppendorf) in 30 µL reaction volume consisting of 3 µL of buffer (10x), 1 µL of $MgCl_2$ (50 mM), 0.6 µL of dNTP (10 mM), 0.6 µL of each primer (Table 1), 3 µL of BSA (10 µg μL^{-1}) (New England BioLabs), 0.1 µL of Silver Star DNA polymerase (Eurogentec), 19.1 µL of sterile distilled water and 2 µL of DNA (20 ng μL^{-1}). PCR products were visualized by 2% TBE gel electrophoresis.

2.6. Community-Level Physiological Profiling (CLPP) of bacteria

The isolated bacteria strains were distributed in 96-well Biolog™ Ecoplates (AWEL International) (150 µL/well with a concentration equivalent to 10^8–10^9 CFU mL^{-1} determined by comparison with a McFarland standard solution, bioMérieux® SA).

These plates check simultaneously the metabolic reaction of the bacterial suspensions regarding 31 lyophilized substrates and a negative control present in triplicate on each plate. The plates were incubated at 27 °C in the dark. Optical density (OD) readings were measured

at 590 nm with a microplate reader (Multimo microplate reader, Synergy HT, Biotek) after 24 h, 48 h and 5 days of incubation. To minimize the effect of difference in densities between plates, data were standardized as follows: the average well color development (ACWD) was calculated for each plate; then, the blanked absorbance value of each well was divided by the ACWD of the corresponding plate to get a corrected OD value (Garland and Mills, 1991). All corrected OD values were set to fall within 0 and 2 (boundary limits) and were then used for Principal Components Analyses with R (version 3.1.3.). In the Vegan R-Package, the Anosim test using Bray-Curtis distance was employed to compare the data.

2.7. In vitro antagonism of bacteria against three GTD pathogenic fungi

The antagonistic capacity of the 19 bacterial isolates against 3 GTDs pathogenic fungi, *i.e. L. pseudotheobromae*, *N. parvum*, and *S. commune*, was determined by employing dual culture technique. Bacterial strains were streaked at the edges of Petri plates containing PDA (Potato Dextrose Agar, Biokar diagnostics, France) and incubated at 28 °C for 24 h. For each pathogenic fungus, a 6 mm mycelial plug was placed on the center of each plate. The plates were then incubated at 26 °C for 5 days. For each fungus, control plates were made with only the mycelium plug. All experiments were performed in triplicate. The percentage of growth inhibition was calculated using the formula, $(R_1 - R_2)/R_1 x100$, where R_1 is the radial distance (mm) grown by pathogenic fungi in the direction of the antagonist, and R_2 is the radial distance (mm) grown by pathogenic fungi (Whipps, 1987).

2.8. Siderophore production by bacteria

The ability to excrete siderophores, *i.e.* iron-complexing organic ligands known to provide a competitive advantage to microorganisms in iron-depleted environments (Duijff et al., 1994; Lugtemberg and Dekkers, 1999), was evaluated under Fe^{3+} limiting conditions by a plate assay adapted from Schwyn and Neilands (1987). Fresh cultures were plated onto CAS blue-agar [2.5% nutrient broth (NB, Conda), 1.5% agar, 0.1 M piperazin-1,4-bisethanesulfonic acid (PIPES), 10 µM Chrome Azurol S (Sigma) and 0.2 mM hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA, Sigma)]. When Fe^{3+} was removed from the Chrome Azurol S complex by high-affinity bacterial siderophores, the colour of plates changed from blue to orange.

Siderophore production was then measured after one week of incubation based on the size of the orange haloes (ds) formed around the colonies. The strains were denoted sid^{+}, sid^{++} and sid^{+++} respectively when 0 mm<ds≤5 mm, 5<ds≤10 mm and ds>10 mm. The experiment was made in triplicate.

2.9. Phosphate solubilisation by bacteria

The 19 bacterial strains were screened for phosphate solubilisation on Pikovskaya agar medium (PVK) [$(NH_4)_2SO_4$, 0.5g L^{-1}; yeast extract, 0.5 g L^{-1}; calcium phosphate ($Ca_3(PO4)_2$), 5 g L^{-1}; KCl, 0.2 g L^{-1}; Magnesium sulphate (MgSO4, $7H_2O$), 0.1 g L^{-1}; glucose, 10 g L^{-1}; Agar, 15 g L^{-1}; $MnSO_4$, $2H_2O$, 0.002 g L^{-1}; $FeSO_4$,$7H_2O$ 0.002 g L^{-1}; pH=7]. Bacterial plugs (5 mm diameter) from fresh R2A pre-cultures of each isolate were placed on the center of PVK agar plates and incubated at 29 °C. Eight repetitions were made for each bacterial strain. The solubilisation zone was determined 10 and 15 days after inoculation by subtracting the diameter of bacterial colony from the diameter of total zone (dp). The strains were denoted $phos^{+}$, $phos^{++}$ and $phos^{+++}$ respectively when 5 mm<dp≤15 mm, 15<dp≤30 mm and dp>30 mm.

2.10. Assessment of plant protection induced by bacterial strain B6 against N. parvum attack

2.10.1. Grapevine material and experimental design

A total of 150 cuttings of cv. Muscat d'Italie originating from INRA experimental vineyards near Bordeaux, were used in the *N. parvum* wood inoculation bioassay. They were processed and prepared as described by Laveau et al. (2009) in a greenhouse in INRA precincts (Villenave d'Ornon, Bordeaux, France).

Five treatments, each applied on 30 plants, were tested: *i)* C: control plants not inoculated with the fungal pathogen nor with the bacteria tested, *ii)* CP: plants treated with sterile TSB medium and inoculated with a sterile malt agar plug, *iii)* NP: plants inoculated with *N. parvum*, *iv)* B6: plants inoculated with the antagonist *Bacillus subtilis* strain B6, *v)* NP+B6: plants inoculated with both *N. parvum* and *B. subtilis* strain B6.

2.10.2. Strain of the pathogenic fungus, N. parvum, used to inoculate plants

The strain of *N. parvum* used in this assay was isolated in 2013 in a vineyard of the Mornag region, in Tunisia. It was stored at 4 °C on Malt Agar (MA) medium, and, 6-7 days before artificial inoculation, it was subcultured onto MA and incubated at 22 °C.

2.10.3. The bacterial strain B6 used to protect plants

The bacterial strain tested for its potential antagonistic ability was a *Bacillus subtilis* strain B6 isolated from the inner trunk and selected based on the *in vitro* antagonism assay described above. Before the inoculation, the bacterial strain was grown at 28 °C for 24 h in TSB (Tryptocasein Soy Broth, Conda, Spain).

2.10.4. Bacterial strain B6 and N. parvum co-inoculation

Before the co-inoculation, the stem of each plant was surface-sterilized with 95% ethanol, then, the center of each stem cutting, below the upper bud, was artificially wounded by drilling a hole in the pith (4 mm diameter). The wound was then immediately drop-inoculated with 40 µL of the bacterial strain B6 suspension (10^8–10^9 CFU mL^{-1} determined by comparison with a McFarland standard solution, bioMérieux® SA). Once the liquid was dried 20-40 min at air temperature, the hole was filled with a *N. parvum* mycelium plug excised from the margin of a fresh mycelial MA culture, with the mycelium facing the internal part of the stem. The treated wounds were then wrapped with a plastic film for being protected during all the incubation period.

2.10.5. Symptoms assessment

After an incubation period of 120 $\pm$ 5 days, the presence of external cankers was assessed visually on every cutting. Then, the bark was removed and the stem of each plant was cut longitudinally, and the percentage of the internal vascular lesions or necrosis in the cutting was recorded by dividing the size of necrosis downwards from the wound-inoculation hole “SN” by the size of the shoot “SS” [(SN/SS)*100] (Fig. 5A).

2.10.6. Statistical analyses

All the statistical analyses were done using R statistical software, version 3.1.3. The data were first subjected to the Shapiro-Wilks and Levene’s tests to check the normality and equality of variances before being subsequently subjected to the non-parametric Kruskal-Wallis test and the relative contrast effects analysed by the nparcomp package (version 2.0). For SSCP and CLPP data, in the Vegan R-Package, the Anosim test using Bray-Curtis distance was employed to compare the data.

3. Results

3.1. Genetic structure of the bacterial communities inhabiting the wood tissues of Tunisian mature grapevines

A total of 30 SSCP profiles were generated from the wood samples collected in Tunisian vineyards. According to the number of peaks and the relative height of the baseline, the SSCP profiles revealed complex bacterial communities (data not shown). The distribution of the samples on the principal plan generated by the PCA analysis is represented in Fig. 2. PCA eigenvalues indicate that the first two principal components, Dim1 and Dim2, account for 51% of the total bacterial variability. Bacterial communities differed depending on the type of tissue they inhabited ($P<0.01$), *i.e.* healthy (non-necrotic) (HW), necrotic (NW) and cordon ends (CE).

3.2. Characterization of the bacterial strains isolated from the grapevine wood samples

Based on partial 16S rRNA and *rpo*B genes sequence similarity (Table 2), the bacterial strains belonged to *Bacillus* species (12 strains), *i.e. Bacillus invictae* (7 strains), *Bacillus safensis* (2 strains), *Bacillus amyloliquefaciens* (1 strain), *Bacillus pumilus* (1 strain) and *Bacillus subtilis* (1 strain). Other bacterial species were identified: *Pantoea agglomerans* (4 strains), *Curtobacterium flaccumfaciens* (1 strain) and *Pseudomonas* species (2 strains), *i.e. Pseudomonas* sp. (1 strain) and *Pseudomonas fluorescens* (1 strain).

The 5 antibiotic encoding genes were detected in only one strain, *B. subtilus* strain B6. Another strain, *B. invictae* strain B14, possessed the 4 fengycin genes while the other *Bacillus* strains expressed at least 1 out of 4 genes. Three out of 4 of the *P. agglomerans* strains had one of the 5 genes investigated. One isolate of *P. fluorescens* had one fengycin gene, whereas no gene detection was obtained for *Pseudomonas* strain B16. For *C. flaccumfaciens* strain B1, none of the 5 genes were detected (Table 2).

Regarding the PGP traits, *i.e.* (i) phosphate solubilisation and (ii) siderophores production, 13 strains demonstrated both of the characteristics evaluated (Table 2).

(i) All the bacterial strains produced siderophores: 15 strains developed small haloes, ranging from 1 to 5 mm (sid+ strains); and *B. invictae* strain B14 and *Pseudomonas* sp. strain B16 produced the greater halo zones, respectively 23 and 14 mm.

(ii) Thirteen strains developed sharp phosphate solubilisation zones, ranging from 5 to 30 mm and 9 to 37 mm, respectively after 10 and 15 days. Five strains, *i.e.* 3 *Bacillus* spp. (strains

B2, B3, B4) and two *P. agglomerans* (strains B10, B17), produced zones greater than 20 mm. *B. safensis* B4 was the most efficient phosphate solubilizer (37 mm after 15 days).

3.3. Community-level physiological profiles of the isolated bacteria

The strains distribution on the principal plan generated by the PCA is represented in Fig. 3. PCA eigenvalues indicate that Dim1 and Dim 2 account for 50% of the total variability. In comparison with *Bacillus* spp. strains, those of *P. agglomerans* were more scattered on Dim1 (Fig. 3). No distinctive patterns in their use of carbon sources were obtained with the 19 bacterial strains ($P>0.05$) (data not shown). The calculation of Average Well Color Development (AWCD) for each replicate showed that the 19 strains were able to transform at least 7 carbon sources after 24 h, 48 h and 120 h incubation. *P. agglomerans* B19 was the strain that metabolized the most carbon sources after 120 h incubation (data not shown). No differences were observed for bacteria isolated in healthy or necrotic wood tissues ($P>0.05$) (data not shown).

3.4. In vitro bacterial antagonism against three GTDs pathogenic fungi

The 19 bacterial strains showed variable inhibition percentages for the three fungal pathogens tested, *i.e. L. pseudotheobromae* ($P<0.01$), *N. parvum* ($P<0.01$), and *S. commune* ($P<0.01$). They ranged from 2.5% to 81.5%, the mean being 24.9% (Table 3). Of the 19 bacteria screened for their antagonistic ability, 6 strains had an inhibitory effect on the 3 fungal pathogens (strains B4, B6, B11, B15, B16 and B18), 11 strains only inhibited *N. parvum* (Fig. 4), 9 strains inhibited *L. pseudotheobromae* and 18 strains inhibited *S. commune*. The most efficient antagonistic bacteria for the 3 pathogenic fungi was *B. subtilis* B6 (Table 3).

3.5. Assessment of plant protection induced by bacterial strain B6 against N. parvum attack

All the stems of Muscat d'Italie cultivar co-inoculated with *N. parvum* and the bacterial strain B6, showed internal necrotic lesions. For the control cuttings inoculated with the pathogen *N. parvum* only, the percentage of necrosis was 80% at the end of the 120±5 day-incubation period. *B. subtilis* strain B6 significantly reduced the percentage of necrosis ($P<0.05$) caused by *N. parvum* by 35 % when compared with control cuttings inoculated by *N. parvum* only (Fig. 5B and C). A slight lesion, due to the drilling effect, was observed after the

inoculation of stems with bacteria in the absence of the fungal pathogen and in control cuttings "CP" inoculated with a sterile MA plug (Fig. 5 C).

4. Discussion

To our knowledge, this report is the first that describes by molecular, microbiological and biochemical approaches that diverse bacterial communities inhabit the wood tissues of Tunisian grapevines, some of these bacteria being endowed with antagonistic activities against one GTDs pathogenic fungus, *i.e. N. parvum*.

Necrotic and non-necrotic tissues were present in cordons of grapevines showing external GTDs-foliar symptoms . This observation is in line with Maher et al. (2012) and Bruez et al. (2014, 2015) who sampled esca-symptomatic or asymptomatic grapevines in French vineyards. Molecular fingerprinting analyses (SSCP) revealed that complex and diverse bacterial communities inhabit the inner wood tissues of Tunisian grapevines. These communities are tissue-dependent since they differed in the healthy and necrotic wood tissues. The same type of information was reported by Bruez et al. (2015) with a cultivar, Cabernet Sauvignon, planted in France. All these result support the point that whatever the cultivar and the country of sampling, identifying various bacterial communities in the necrotic and non-necrotic wood tissues is a common trait of these communities.

For the 19 most abundant bacteria selected on their morphology, sequencing of the 16S rRNA gene led to the identification of 4 genera: *Bacillus* (12 strains), *Pantoea* (4 strains), *Pseudomonas* (2 strains) and *Curtobacterium* (1 strain). Five *Bacillus* species: *B. amyloliquefaciens*, *B. invictae*, *B. pumilus*, *B. safensis* and *B. subtilis* have been identified after sequencing of the *rpo*B gene. In the literature (West et al., 2010; Compant et al., 2011; Marasco et al., 2013; Pinto et al., 2014), those bacteria are described as frequent and common colonizers of grapevine organs and tissues, *i.e.* flower, berries, leaves, seeds, roots and vessels. Similarly, for the *Pseudomonas* genus, *i.e. Pseudomonas* spp. and *P. agglomerans*, Compant et al. (2011) and Rolli et al. (2015) reported they are inhabitants of grapevines organs and tissue.
As regards the biological properties of bacterial species, such as *B. amyloliquefaciens* isolated in the present study, reports have shown they have a wide spectrum of antifungal activity (Alfonzo et al., 2012) and they can protect grapevines (Trotel-Aziz et al., 2008 ; Haidar et al., 2016) or tomato plants from pathogenic attacks (Sadfi et al., 2008). Consequently our results support these earlier reports by showing that bacterial strains inhabiting the wood tissues of Tunisian mature grapevines have antagonistic traits (*e.g.* antibiotic genes, siderophore production, carbon source use) or are able to control a pathogen involved in GTDs.

If we focus on these 3 antagonistic traits, it can be mentioned that:

(i) All the *Bacillus* isolated strains expressed differentially at least one of the 5 antibiotic genes investigated, with only the strain *B. subtilis* B6 having the 5 encoding genes. These results agree with Jacques et al. (1999) on *B. subtilis* and, Koumoutsi et al. (2004) on *B. amyloliquefaciens*, to produce fengycins. According to Hofemeister et al. (2004), Koumoutsi et al. (2004) and Jourdan et al. (2009), the function of the fengycin and iturin families is related to antimicrobial properties. For instance, they display specific fungitoxic activity against filamentous fungi (Nishikori et al., 1986). Ongena and Jaques (2007) reported that iturin family has a strong *in vitro* antifungal action against a wide variety of yeast and fungi.

(ii) For siderophore production, *Pseudomonas* sp. strain B16 was the highest producer. Strains from this genus are frequently reported as siderophore producers, as shown by Cabrefiga et al. (2007) and Renault et al. (2007). Siderophores are known to play a role in the control of some plant diseases and in the suppression of several phytopathogens (Duffy and Défago, 1999; Whipps, 2001).

(iii) As regards the global metabolism of the isolated bacteria and their ability to compete for nutrients, the carbohydrates group was the most intensively metabolized by the 19 strains after 24 h, 48 h and 120 h, with *P. agglomerans* strain B19 being the highest metabolizer.

Based on the contribution of phosphate-solubilizing bacteria in plant nutrition (Goldstein, 1986) and plant growth performance (Rodriguez and Fraga, 1999), it was also shown that the bacteria isolated from the wood of grapevines have another trait, phosphate solubilisation, that can be useful to select a bacterial strain. For instance, *B. safensis* strain B4 was the most efficient to solubilize phosphate. This beneficial effect on plants has been reported many times; for example, Chabot et al. (1993, 1996*a*, 1996*b*) showed that two strains of *Rhizobium leguminosarum*, capable of mineral phosphate solubilization, were able to stimulate the growth of maize and lettuce.

The ability of bacterial strains to act as fungal antagonists was assessed in a dual-culture assay. The isolated bacteria were used to control 3 plant pathogenic fungi involved in GTDs, *i.e. N. parvum*, *S. commune* and *L. pseudotheobromae*. In the *in vitro* assay, the greater inhibition zone of the 3 fungal pathogens was obtained with the *B. subtilis* strain B6. This strain was chosen for the *in planta* assay. In another experiment, Alfonzo et al. (2008) reported that *B. subtilis* strains inhibit *in vitro* growth of 3 other pathogenic fungi involved in Esca, *i.e.*

Phaeoacremonium aleophilum, *Phaemoniella chlamydospora* and *Fomitiporia mediterranea*. So, *B. subtilis* strains seems to be relevant BCA candidate to control pathogens of GTDs.

The greenhouse assay on cv. Muscat d'Italie cuttings showed that, *B. subtilis* strain B6, reduced by 35%, the size of necrosis when it was co-inoculated *in planta* with the pathogen *N. parvum*. This finding is in agreement with previous reports on the capacity of *Bacillus* strains to control plant diseases (Emmert and Handelsman, 1999; Collins et al., 2003; Toure et al., 2004; Trotel-Aziz et al., 2008; Essghaier et al., 2014) and is of the utmost importance because *N. parvum* is a GTDs fungal pathogen for which no efficient treatments are currently available.

To conclude, our study showed that various bacterial strains colonize the wood tissues of grapevine planted in Tunisia. The bacterial strain *B. subtilis* B6 was the most interesting bacterium to control wood necrosis caused by *N. parvum* on the table grape cultivar Muscat d'Italie, the most widespread cultivar planted in Tunisia. Further research should be carried out in the vineyards to test the ability of the strain B6, but also of other isolated bacteria that have interesting BCA traits, to control infections by *N. parvum* and the other fungi involved in GTDs.

Acknowledgements

The authors are grateful to the program PHC-Utique France-Tunisie managed by CMCU (project 13G0924), French Ministry in charge of Agriculture (Casdar program V1302), Poupelain Foundation and International Organisation of Vine and Wine (OIV). We are grateful to Javid Ojaghi (Genetic Resources Institute of Azerbaijan National Academy of Sciences) for his help on statistical analyses, Mokhtar Dridi (Laboratoire de Protection des Végétaux, Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT) 2049, Ariana, Tunisia) for his help on sampling vines. We are also indebted to the INRA UMR-SAVE technical staff, Gilles Taris and Sébastien Gambier, for their valuable help for the greenhouse and laboratory experiments. The authors also thank the reviewers for helpful comments to improve the manuscripts.

References

Alfonzo, A., Ventorino, V., Torta, L., Burruano, S., Moschetti, G., 2008. "In Vitro" antagonism of a grapevine endophytic *Bacillus subtilis* strain towards "esca" fungi. IOBC/wprs Bulletin.36, 19-24.

Alfonzo, A., Lo Piccolo, S., Conigliaro, G., Ventorino, V., Burruano, S., Moschetti, G., 2012. Antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 active against grapevine fungal pathogens. Ann Microbiol. 62, 1593–1599.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402.

Alvarez, F., Castro, M., Principe, A., Borioli, G., Fischer, S., Mori, G., Jofre, E., 2011. The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease. J. Appl. Microbiol. 112, 159-174.

Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R.A., Ulrich, A., Hallmann, J., 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. FEMS Microbiol. Ecol. 51, 215–229.

Bertsch, C., Ramirez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou- Mansour, E., 2013. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. Plant Pathol. 62, 243–265.

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

Bruez, E., Vallance, J., Gerbore, J., Lecomte, P., Da Costa, J.P., Guerin-Dubrana, L., Rey, P., 2014. Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of Esca leaf-symptomatic and asymptomatic vines. PLoS One 9, e95928.

Bruez, E., Haidar, R., Alou, M.T., Vallance, J., Bertsch, C., Mazet, F., Fermaud, M., Deschamps, A., Guerin-Dubrana, L., Compant, S., Rey, P., 2015. Bacteria in a wood fungal disease: characterization of bacterial communities in wood tissues of esca-foliar symptomatic and asymptomatic grapevines. Front. Microbiol. 6, article 1137.

Bulgari, D., Casati, P., Brusetti, L., Quaglino, F., Brasca, M., Daffonchio, D., Bianco, P.A., 2009. Endophytic bacterial diversity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves described by 16S rRNA gene sequence analysis and length heterogeneity-PCR. J. Microbiol. 47, 393-401.

Cabrefiga, J., Bonaterra, A., Montesinos. E., 2007. Mechanisms of antagonism of *Pseudomonas fluorescens* EPS62e against *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight. Int. Microbiol. 10, 123-132.

Chabot, R., Antoun, H., Cescas, Michel, P., 1993. Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. Can. J. Microbiol. 39, 941–947.

Chabot, R., Antoun, H., Kloepper, J.W., Beauchamp, C.J., 1996a. Root colonization of maize and lettuce by bioluminiscent *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*. Appl. Environ. Microbio. 62, 2767–2772.

Chabot, R., Hani, A., Cescas, P.M., 1996b. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*. Plant Soil 184, 311-321.

Collins, D. P., Jacobsen, B. J., Maxwell, B., 2003. Spatial and temporal population dynamics of a phyllosphere colonizing *Bacillus subtilis* biological control agent of sugar beet cercospora leaf spot. Biol. Control. 26, 224-232.

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., Ait Barka, E., 2005 a. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Appl. Environ. Microbio. 71, 4951- 4959.

Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C., Ait Barka, E., 2005b. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. Appl. Environ. Microbio. 71, 1685- 1693.

Compant, S., Kaplan, H., Sessitsch, A., Nowak, J., Ait Barka, E., Clément, C., 2008a. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. FEMS Microbiol. Ecol. 63, 84- 93.

Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A., 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization Soil Biol. Biochem. 42, 669-678.

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

Duffy, B.K., Défago, G., 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. Appl. Environ. Microbiol. 65, 2429-2438.

Duijff, Ben.J., Bakker, Peter.A.H.M., Schippers, B., 1994. Suppression of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas putida* WCS358 at different levels of disease incidence and iron availability. Biocontrol. Sci. Technol. 4, 279-288.

Emmert, E.A.B., Handelsman, J., 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. FEMS Microbiol. Lett. 171, 1–9.

Essghaier, B., Dhieb, C., Rebib, H., Ayari, S., Rezgui, A., Boudabous, A., Sadfi-Zouaoui, N., 2014. Antimicrobial behavior of intracellular proteins from two Moderately halophilic bacteria: strain J31 of *Terribacillus halophilus* and strain M3- 23 of *Virgibacillus marismortui*. J. Plant. Pathol. Microb. 5, 1000214.

Garland, J.L., Mills, A.L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. Appl. Environ. Microbiol. 57, 2351-2359.

Goldstein, A.H., 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. Am. J. Alternative. Agr. 1, 51-57.

Gray, E.J., Smith, D.L., 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant bacterium signaling processes. Soil Biol. Biochem. 37, 395-412.

Haidar, R., Deschamps, A., Roudet, J., Calvo-Garrido, C., Bruez, E., Rey, P., Fermaud, M., 2016. Multi-organ screening of efficient bacterial control agents against two major pathogens of grapevine. Biol. Control. 92, 55–65

Hardoim, P.R., Van Overbeek, L.S., Van Elsas, J.D., 2008. Properties of bacterial endo-phytesand their proposed role in plant growth. Trends. Microbiol. 16, 463-471.

Hofemeister, J., Conrad, B., Adler, B., Hofemeister, B., Feesche, J., Kucheryava, N., Steinborn, G., Franke, P., Grammel, N., Zwintscher, A., Leenders, F., Hitzeroth, G., Vater, J., 2004. Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. Mol. Gen. Genomics. 272, 363-378.

Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., 2003. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. J. Biotechnol. 106, 169-178.

Iniguez, A.L., Dong, Y., Carter, H.D., Ahmer, B.M.M., Stone, J.M., Triplett, E. W., 2005. Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. Mol. Plant Microbe Interact. 18, 169-178.

Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E., Thonart, P., 1999. Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman design. Appl. Biochem. Biotech. 77, 223-233.

James, E.K., Gyaneshwar, P., Manthan, N., Barraquio, W.L., Reddy, P.M., Ianetta, P.P.M., Olivares, F.L., Ladha, J.K., 2002. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. Mol. Plant Microbe Interact. 15, 894-906.

Jourdan, E.; Henry, G., Duby, F., Dommes, J., Barthélemy, J.P., Thonart, P., Ongena, M., 2009. Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. Mol. Plant Microbe Interact. 22, 456-468.

Koumoutsi, A., Chen, X.H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., Borriss, R., 2004. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. J. Bacteriol. 186, 1084-1096.

Kuklinsky-Sobral, J., Araujo, W.L., Mendes, R., Pizzirani-Kleiner, A.A., Azevedo, J.L., 2005. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. Plant Soil 273, 91-99.

Laveau, C., Letouze, A., Louvet, G., Bastien, S., Guerin-Dubrana, L., 2009. Differential aggressiveness of fungi implicated in Esca and associated diseases of grapevine in France. Phytopathol. Mediterr. 48, 32–46.

Lin, G.H., Chen, C. L., Tschen, J. S. M., Tsay, S.S., Chang, Y.S., Liu, A.T., 1998. Molecular clonining and characterization of fengycin synthetase gene fen B from *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 180, 1338-1341.

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 and sensory attributes of Cabernet Sauvignon grapes musts and wines. Aust. J. Grape Wine Res. 18, 64–72.

Lugtemberg, B.J.J., Dekkers, L.C., 1999. What makes Pseudomonas bacteria rhizosphere competent? Environ. Microbiol. 1, 9-13.

Maher, N., Piot, J., Bastien, S., Vallance, J., Rey, P., Guerin-Dubrana, L., 2012. Wood necrosis in esca-affected vines: types, relationships and possible links with foliar symptom expression. J. Int. Sci. Vigne Vin. 46, 15-27.

Marasco, R., Rolli, E., Fusi, M., Cherif, A., Abou-Hadid, A., El-Bahairy, U., Borin, S., Sorlini, C., Daffonchio, D., 2013. Plant Growth Promotion Potential Is Equally Represented in Diverse Grapevine Root-associated Bacterial Communities from Different Biopedoclimatic Environments. BioMed. Res. Int. ID 491091.

Martins, G., Lauga, B., Miot-Sertier, C., Mercier, A., Lonvaud, A., Soulas, M.L., Soulas, G., Masneuf-Pomarede, I., 2013. Characterization of epiphytic bacterial communities from grapes, leaves, bark and soil of grapevine plants grown, and their relations. Plos One 8, e73013.

Miché, L., Battistoni, F., Gemmer, S., Belghazi, M., Reinhold-Hurek, B., 2006. Upregulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp. Mol. Plant Microbe Interact. 19, 502-511.

Misaghi, I.J., Donndelinger, C.R., 1990. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. Phytopathol. 80, 808-811.

Nishikori, T., Naganawa, H., Muraoka, Y., Aoyagi, T., Umezawa, D.H., 1986. Plipastatins; new inhibitors of phospholipase A2, produced by *Bacillus cereus* BMG302-fF67. III. Structural elucidation of plipastatins. J. Antibiot. 39, 755-761.

Ongena, M., Jacques, P., 2007. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol. 16, 115-125.

O'Sullivan, D J., O'Gara, F., 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* sp. involved in suppression of plant pathogens. Microbiol. Rev. 56, 662-676.

Pinto, C., Pinho, D., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., Gomes, A.C., 2014. Unravelling the Diversity of Grapevine Microbiome. Plos One. 9, e85622.

Ramarathnam, R., Bo, S., Chen, Y., Fernardo, W.G., Xuewen, G., De Kievit, T., 2007. Molecular and biochimical detection of fengycin and bacillomycin D-producing *Bacillus* spp., antagonistic to fungal pathogens of canola and wheat. Can. J. Microbiol. 53, 901-911.

Redford, A. J., Bowers, R. M., Knight, R., Linhart, Y., Fierer, N., 2010. The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. Environ. Microbiol. 12, 2885-2893.

Renault, D., Deniel, F., Benizri, E., Sohier, D., Barbier, G., Rey, P., 2007. Characterization of Bacillus and Pseudomonas strains with suppressive traits isolated from tomato hydroponic-slow filtration unit. Can. J. Microbiol. 53, 784–797.

Rodriguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnol. Adv. 17, 319-339.

Rolli, E., Marasco, R., Vigani, G., Ettoumi, B., Mapelli, F., Deangelis, M.L., Gandolfi, C., Casati, E., Previtali, F., Gerbino, R., Pierotti Cei, F., Borin, S., Sorlini, C., Zocchi, G., Daffonchio, D., 2015. Improved plant resistance to drought is promoted by the root-

associated microbiome as a water stress-dependent trait. Environ. Microbiol. 17(2), 316-331.

Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E., 2006. Bacterial endophytes and their inter-action with hosts. Mol. Plant Microbe Interact. 19, 827-837.

Sadfi-Zouaoui, N., Essghaier, B., Hajlaoui, M.R., Fardeau, M.L., Cayol, J.L., Ollivier, B., Boudabous, A., 2008. Ability of moderately halophilic bacteria to control grey mould disease on tomato fruits. J. Phytopatol. 156, 42-52.

Schwyn, B., Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal. Biochem. 160, 47-56.

Sessitsch, A., Reiter, B., Pfeifer, U., Wilhelm, E., 2002. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. FEMS Microbiol. Ecol. 39, 23-32.

Sessitsch, A., Coenye, T., Sturz, A.V., Vandamme, P., Ait Barka, E., Salles, J.F., Van Elsas, J.D., Faure, D., Reiter, B., Glick, B.R., Wang-Pruski, G., Nowak, J., 2005. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant beneficial properties. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 1187-1192.

Toure, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., Thonart, P., 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. J. Appl. Microbiol. 96, 1151–1160.

Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Biagianti, S., Aziz, A., 2008. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. Mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. Environ. Exp. Bot. 64, 21-32.

West, E.R., Cother, E.J., Steel, C.G., Ash, G.J., 2010. The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. Can. J. Microbiol. 56, 209-216.

Whips, J.M., 1987. Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. New. Phytol. 107, 127-142.

Whipps, J M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. J. Exp. Bot. 52, 487-511.

Table 1: Pairs of primers used.

Applications		Gene	Primer name	Sequence 5'3'	Amplicon size	Annealing T°C
Antibiotics screening	Lipopeptide	**Fengycin**	FENAf FENAr	GACAGTGCTGCCTGATGAAA GTCGGTGCATGAAATGTACG	900 bp	54°C
			FENBf FENBr	ATCCATGGTTAAAAACCAAAAT ACGGATCCATGCTATTTGGCAGC	950 bp	54°C
			FENDf FENDr	TTTGGCAGCAGGAGAAGTTT GCTGTCCGTTCTGCTTTTTC	950 bp	53°C
			FENEf FENEr	GCCAAAAAGAAACGAGCAG GTCGGAGCTAACGCTGAAAC	950 bp	53°C
		Bacillomycin	BACCf BACCr	GAAGGACACGGCAGAGAGT CGCTGATGACTGTTCATGC	900 bp	60°C
SSCP	Bacteria	**16S rRNA**	799f[(1)] 1115r*[(1)]	AACMGGATTAGATACCCKG **6-FAM** AGGGTTGCGCTCGTTG	350 bp	54°C
Sequencing	Bacteria	**16S rRNA**	799f 1492r	AACMGGATTAGATACCCKG GTTACCTTGTTACGACTT	750 bp	52°C
		***rpo*B**	*rpo*Bf *rpo*Br	GACGATCATYTWGGAAACCG GGNGTYTCRATYGGACACAT	350 bp	55°C

*Fluorescently labelled primer 6-FAM (6-carboxyfluoresceine)

[(1)] Redford *et al.*, 2010

Table 2. Description and *in vitro* screening results of the bacterial strains. HW: non-necrotic wood, NW: necrotic wood, CE: cordon end, Cat: catalase, Oxi: oxidase, Bacc: bacillomycin, Fe: fengycin. * antagonistic traits: antibiotic genes, siderophore production. ** Plant Growth Promoting (PGP).

Strain	Tissue	Biochemical screening			Molecular screening							Antagonistic *and PGP** traits	
		Gram	**Cat**	**Oxi**	**16S rDNA gene (GeneBank ref, %id)**	***rpo*B gene (GeneBank ref, %id)**	**Bacc**	**FeA**	**FeB**	**FeD**	**FeE**	**Siderophore production**	**Phosphate solubilisation**
B1	HW	+	+	-	*Curtobacterium flaccumfaciens* (JN689331.1, 100%)	-	-	-	-	-	-	+	-
B2	NW	+	+	+	*Bacillus* sp.	*Bacillus invictae* (JX183170.1, 99%)	-	+	-	-	-	++	++
B3	HW	+	+	+	*Bacillus* sp.	*Bacillus safensis* (JX183187.1, 99%)	+	+	-	-	+	+	++
B4	NW	+	+	+	*Bacillus sp.*	*Bacillus safensis* (JX183187.1, 99%)	+	+	-	-	-	+	+++
B5	NW	-	+	+	*Pseudomonas fluorescens* (KC810843.1, 99%)	-	-	+	-	-	-	+	+
B6	NW	+	+	+	*Bacillus* sp.	*Bacillus subtilis* (CP002905.1, 96%)	+	+	+	+	+	+	-
B7	HW	+	+	+	*Bacillus* sp.	*Bacillus invictae* (JX183170.1, 99%)	+	-	+	-	-	+	+
B8	HW	+	-	-	*Bacillus* sp.	*Bacillus pumilus* (AB098578.1, 99%)	-	+	-	-	-	+	+
B9	HW	+	-	+	*Bacillus* sp.	*Bacillus invictae* (JX183170.1, 99%)	+	+	+	-	-	+	+
B10	CE	-	+	-	*Pantoea agglomerans* (FJ357814.1, 99%)	-	-	-	+	-	-	+	++
B11	CE	+	+	+	*Bacillus* sp.	*Bacillus amyloliquefaciens* (CP003332.1, 99%)	+	+	-	-	+	++	-
B12	CE	-	+	-	*Pantoea agglomerans* (FJ357814.1, 99%)	-	-	-	+	-	-	+	++
B13	CE	+	+	+	*Bacillus* sp.	*Bacillus invictae* (JX183170.1, 99%)	-	+	+	+	-	+	++
B14	NW	+	+	+	*Bacillus pumilus*	*Bacillus invictae* (JX183170.1, 99%)	-	+	+	+	+	+++	-
B15	NW	+	+	+	*Bacillus* sp.	*Bacillus invictae* (JX183170.1, 99%)	+	+	+	-	+	+	++
B16	NW	-	+	+	*Pseudomonas* sp.	-	-	-	-	-	-	+++	-
B17	HW	-	+	-	*Pantoea agglomerans* (FJ357814.1, 99%)	-	-	-	-	-	-	+	++
B18	HW	+	+	+	*Bacillus* sp.	*Bacillus invictae* (JX183170.1, 99%)	-	+	+	-	-	+	+
B19	HW	-	+	-	*Pantoea agglomerans* (FJ357814.1, 99%)	-	+	-	-	-	-	+	-

Table 3: Effect of bacterial isolates on the *in vitro* growth of three fungi: *Neofusicoccum parvum, Lasidiodiplodia pseudotheobromae* and *Schizophyllum commune* (% mycelial inhibition). *Percentages of mycelial growth inhibition were determined after 5 days of incubation using Whipps formula (1987). Mean values sharing the same letters are not significantly different according to Kruskal-Wallis' non-parametric relative contrast effects post-hoc test at $P<0.05$.

	N. parvum	***L. pseudotheobromae***	***S. commune***
Bacterial strain	GI (%) (±SE)	GI (%) (±SE)	GI (%)(±SE)
B1	0.0±0.0 a	2.5±0.4 ab	14.9±0.7 de
B2	0.0±0.0 a	33.9±2.7 d	13.6±1.2 de
B3	25.3±2.1 de	0.0±0.0 a	12.1±0.2 ce
B4	13.7±0.2 c	7.0±0.8 b	5.8±0.3 b
B5	0.0±0.0 a	0.0±0.0 a	7.7±0.3 bc
B6	**81.5±0.7 h**	**70.8±3.8 f**	**67.6±1.7 h**
B7	0.0±0.0 a	0.0±0.0 a	16.0±1.0 e
B8	0.0±0.0 a	0.0±0.0 a	10.7±1.4 cd
B9	29.1±2.7 e	0.0±0.0 a	36.7±2.7 g
B10	0.0±0.0 a	0.0±0.0 a	3.7±0.6 ab
B11	71.2±1.8 g	62.3±2.0 e	33.2±2.3 g
B12	0.0±0.0 a	0.0±0.0 a	3.3±0.2 ab
B13	26.6±1.3 e	0.0±0.0 a	7.5±0.5 bc
B14	21.7±0.4 d	5.1±0.6 b	0.0±0.0 a
B15	34.4±1.7 f	28.2±1.3 c	12.6±1.0 de
B16	12.7±0.4 c	3.8±0.4 ab	10.7±2.0 cd
B17	6.7±0.2 b	0.0±0.0 a	15.1±0.9 de
B18	13.9±1.9 c	34.8±0.4 d	21.6±1.8 f
B19	0.0±0.0 a	0.0±0.0 a	5.3±0.5 b

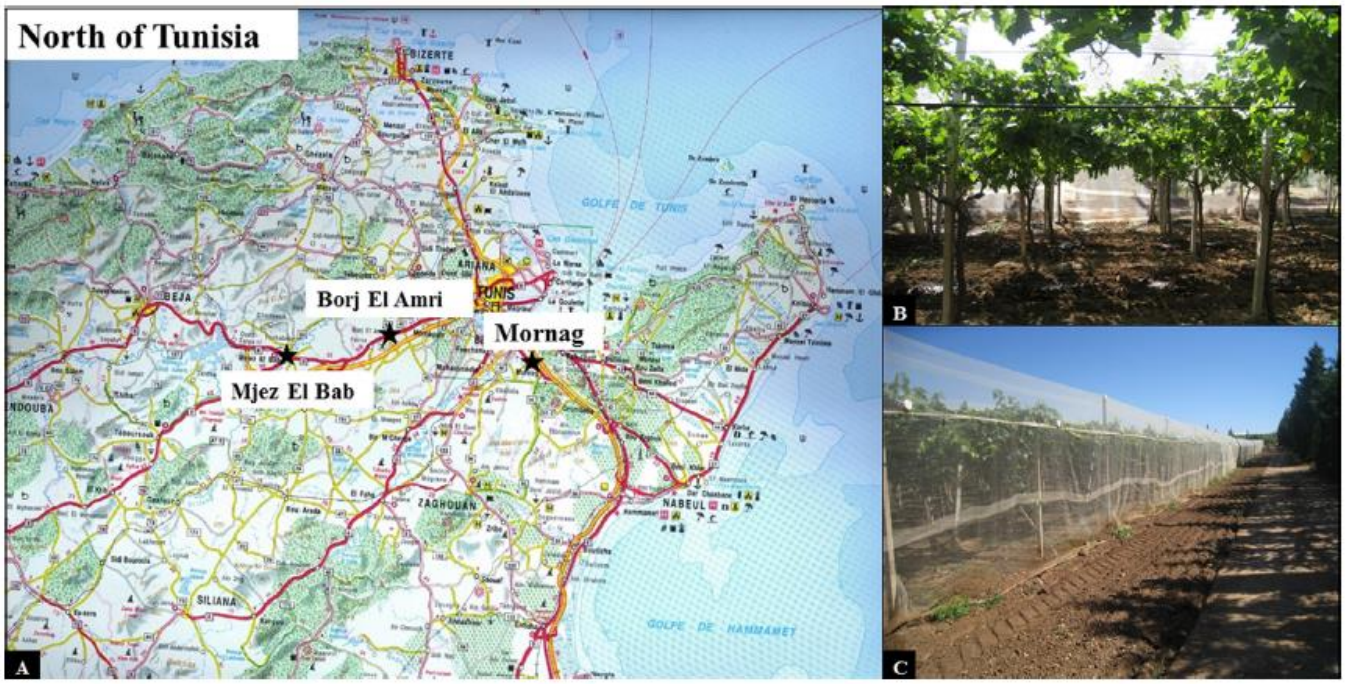

Figure 1. Sampling sites in the North of Tunisia (A) with Muscat d'Italie cultivar trellised as single vines on a pergola system (B) with nets to protect plants from hail (C).

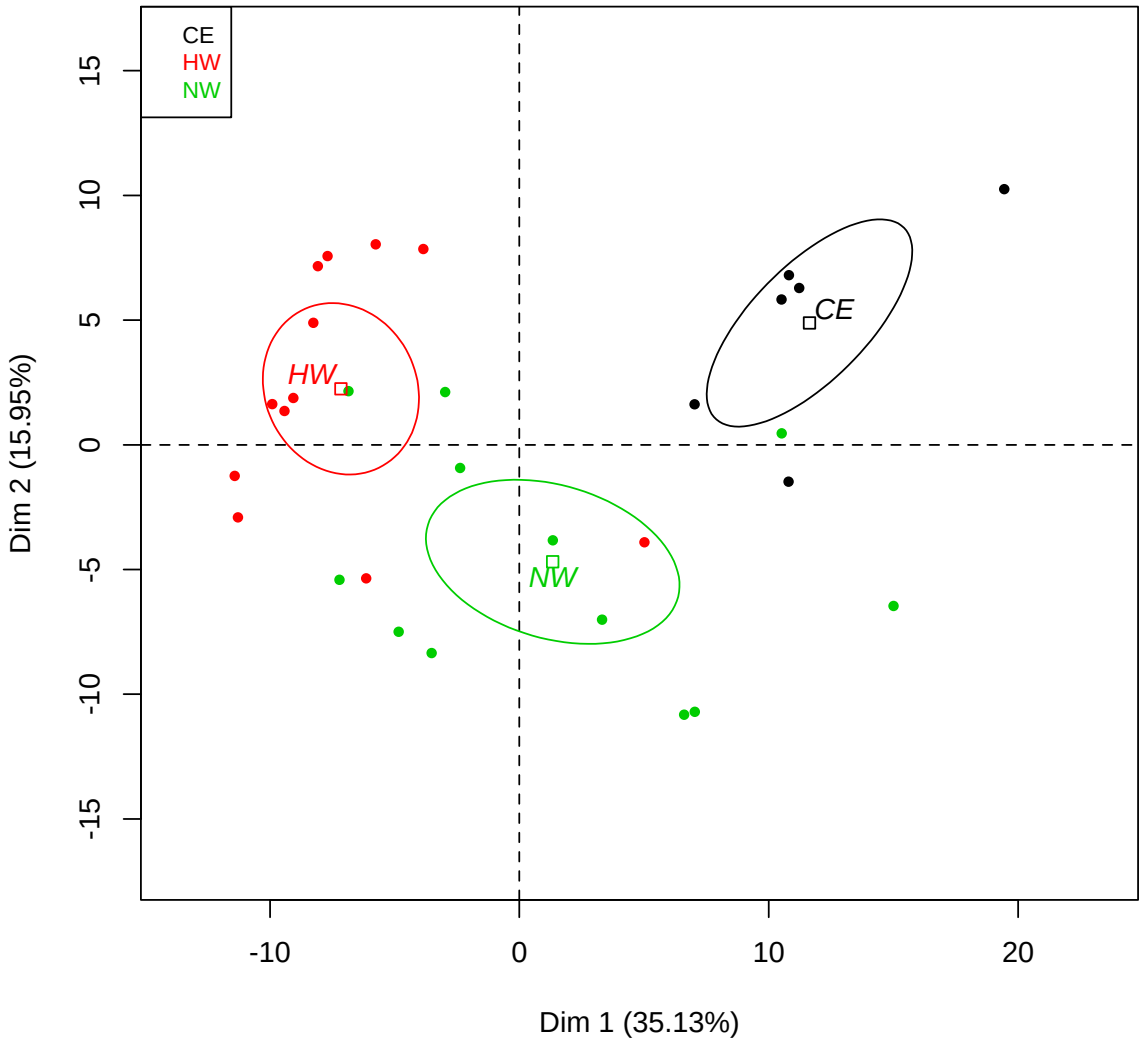

Figure 2. Principal Component Analysis (PCA) of the bacterial communities inhabiting cordon end (CE), necrotic (NW) and non-necrotic tissues (HW) of grapevines sampled from vineyards in the north of Tunisia, based on SSCP profiles. The variation (%) explained by each PCA axis is given in brackets. Ellipses represent the 95% confidence intervals calculated for each community.

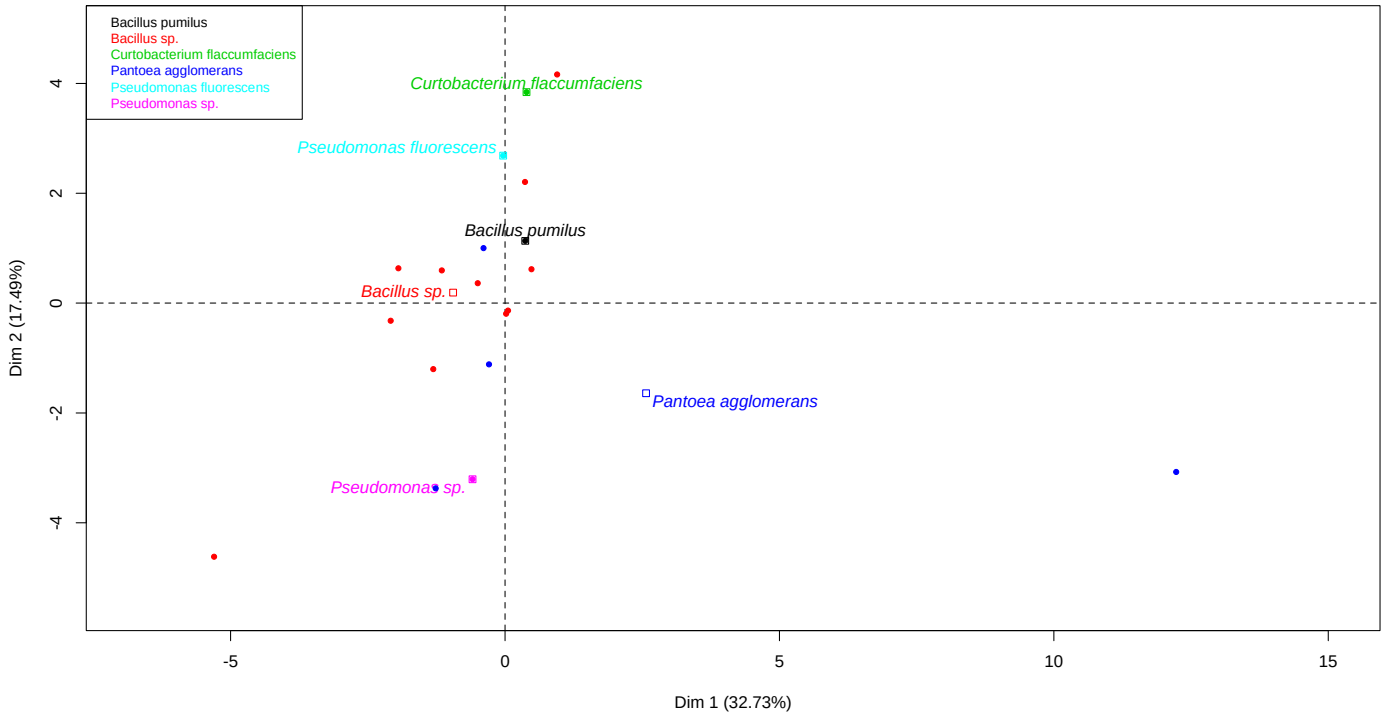

Figure 3. Principal Component Analysis (PCA) of bacterial strains isolated from Tunisian grapevine wood tissues based on their catabolic profile from Biolog Ecoplates™. Points represent means of 3 replicate samples. The variation (%) explained by each PCA axis is given in brackets. Biolog Ecoplates™ were incubated 48h at 27°C in the dark.

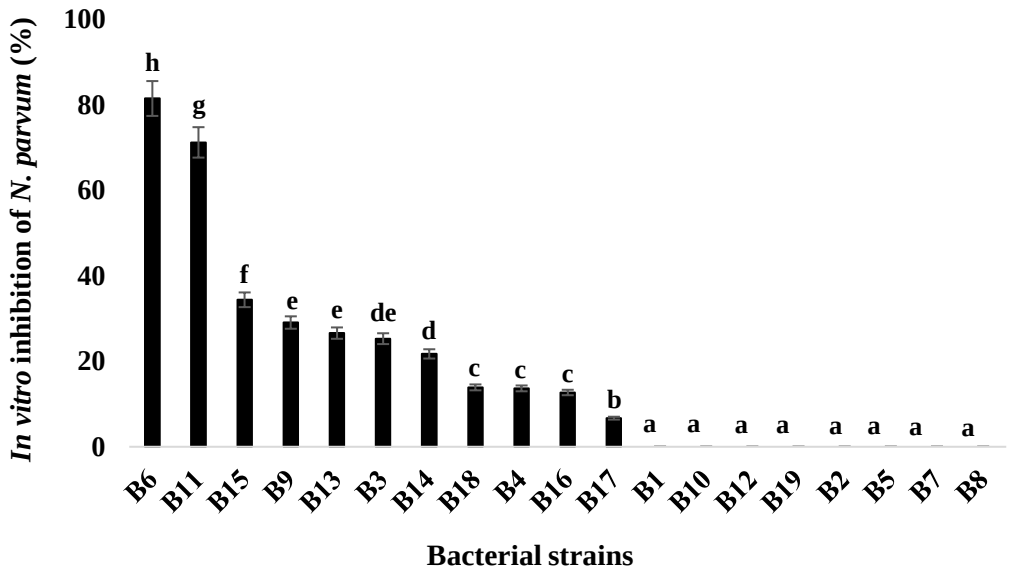

Figure 4. Effect of the endophytic bacterial isolates, applied as 24h-bacterial cultures, on the growth of the plant pathogenic fungus *N. parvum*. Mean values (3 replicates) sharing the same letters are not significantly different according to Kruskal-Wallis' non-parametric relative contrast effects post-hoc test at $P<0.05$.

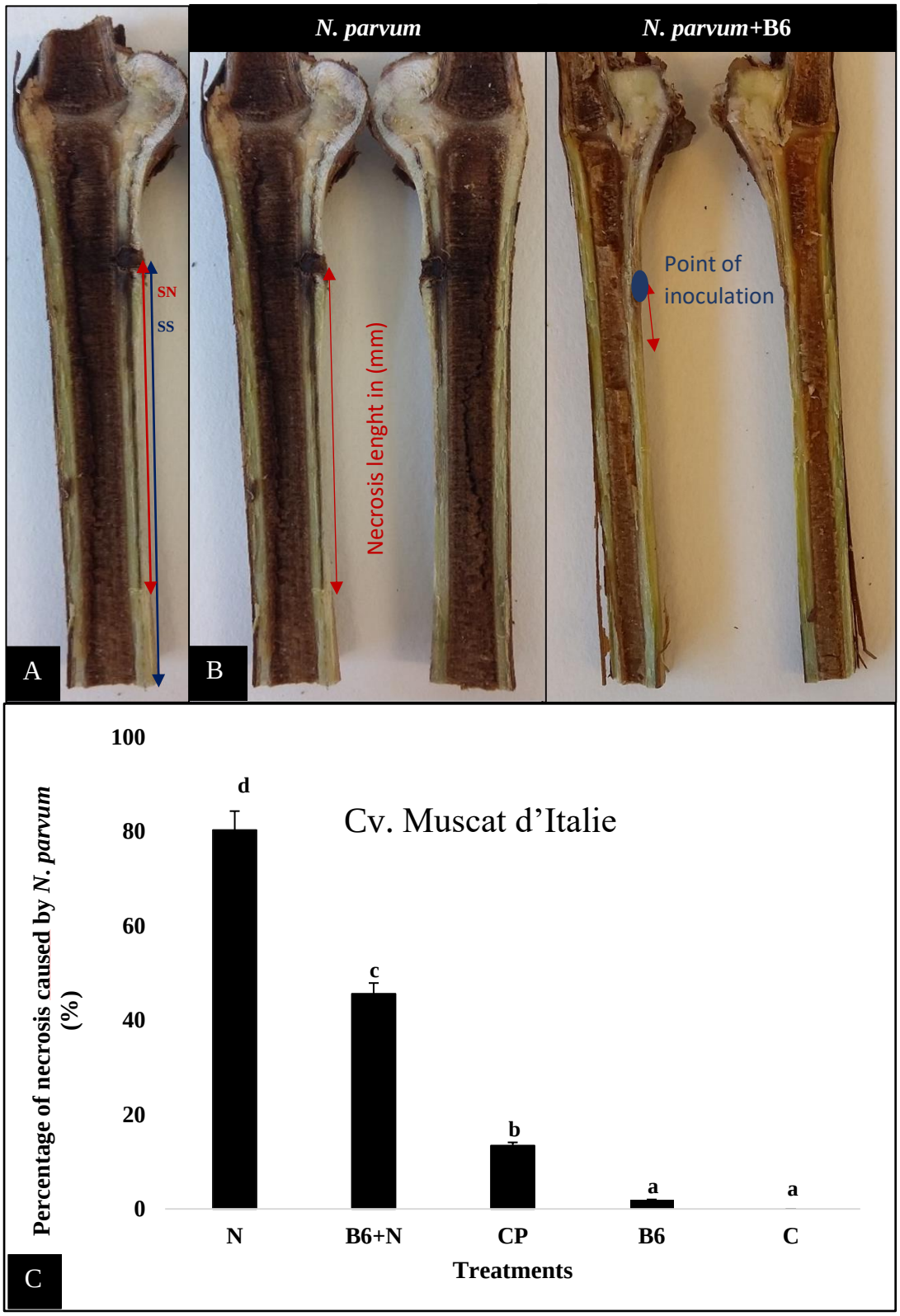

Figure 5. Effect of the *Bacillus subtilis* strain B6 on the necrosis caused by *N. parvum* on young vines of cv. Muscat d'Italie under greenhouse conditions. (A) Percentage of necrosis measurement: [(SN/SS)*100] with SN, the size of necrosis downwards from the wound-inoculation hole and SS, the size of the shoot. (B) Exemples of internal necrosis observed. (C) Percentage values are the mean of 30 measures per treatment. Mean values sharing the same letters are not significantly different according to Kruskal-Wallis' non-parametric relative contrast effects post-hoc test at $P<0.05$. *C: control cuttings not inoculated with the fungus, CP: control cuttings inoculted with sterile malt agar plugs.

Study of *Lasidiodiplodia pseudotheobromae*, *Neofusicoccum parvum* and *Schizophyllum commune*, three pathogenic fungi associated with Grapevine Trunk Diseases in the Northern region of Tunisia (Soumis Phytopathologia Mediterranea)

Awatef REZGUI[1,2], Jessica VALLANCE[2,3], Asma BEN GHNAYA-CHAKROUN[1], Emilie BRUEZ[2], Mokhtar DRIDI[4], Najla SADFI-ZOUAOUI[1] and Patrice REY[2,3]

[1] Laboratoire Microorganismes et Biomolécules Actives, Faculté des Sciences de Tunis, Université de Tunis El Manar, 2092 Tunisia

[2] INRA, UMR 1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, ISVV, F-33882 Villenave d'Ornon, France

[3] Université de Bordeaux, Bordeaux Sciences Agro, UMR 1065 SAVE, F-33175 Gradignan, France

[4] INRAT, Laboratoire de Biotechnologie appliquée à l'agriculture, Ariana 2092, Tunisia

Corresponding author: Patrice REY, E-mail address: patrice.rey@agro-bordeaux.fr.

Summary. Vineyards worldwide are affected by GTDs that lead to vine decline and loss in productivity. Hitherto, GTDs have been poorly studied in Tunisia regarding the disease incidence and the pathogenic fungi involved. To investigate this point, a survey was conducted in 10 vineyards in the North of Tunisia to monitor GTDs, in particular Esca, on cv. Muscat d'Italie used to produce table grapes. The cultivar Muscat d'Italie showed the typical Esca-foliar symptoms with incidence of GTDs ranged from 0.03% to 6%. Investigation on the fungal communities inhabiting the necrotic wood tissues led to the ITS-DNA sequencing identification of 3 pathogenic species known to be involved in GTDs: *Lasidiodiplodia pseudotheobromae*, *Neofusicoccum parvum* and *Schizophyllum commune*. The isolated strains were studied for their (i) *in vitro* mycelial growth depending on the temperature, (ii) *in vitro* competition abilities and (iii) pathogenicity on Muscat d'Italie young vines. Isolation and pathogenicity of these fungi were evidenced for the first time in grapevines used to produce table grapes in Tunisian vineyards.

Keywords: Esca, cv. Muscat d'Italie, fungal pathogens, *in vitro* competition, *in planta* pathogenicity

Abbreviations: GTDs, Grapevine Trunk Diseases, MA, Malt Agar.

Introduction

Viticulture has a long history in Tunisia dating back to the Carthaginian civilization (Zoghlami *et al.*, 2001, 2009). This longstanding viticulture tradition has persisted until now and numerous

international as well as autochthonous cultivars are planted in the Tunisian vineyards. Grapevines are used to produce either wine (12500 ha) or table grapes (4900 ha), accordingly grape is amongst the most important fruit crop in Tunisia (Ben Salem *et al.,* 2000; Zoghlami *et al.,* 2001). Table- and wine-grape productions are of great economic importance in Tunisia and worldwide. Grapevine, *i.e Vitis vinifera* L., is however susceptible to many fungal pathogens that can alter to a considerable extent the yield and/or quality of the harvest (Bertsch *et al.,* 2013; Compant *et al.,* 2013; Steel *et al.,* 2013). Amongst the fungal diseases that can severely damage crops, GTDs, *i.e* Esca, Eutypa and Botryosphaeria diebacks, are among the most severe diseases that affect grapevines worldwide. Although GTDs, mainly Esca, have been recorded for centuries, they have become within the span of a mere two decades, a subject of major concern for the wine industry. GTDs decrease harvest, increase costs, limit grape and wine qualities, and reduce the lifespan of plants in many vine-growing areas (Mugnai *et al.,* 1999; Crous and Gams 2000; Armengol *et al.,* 2001; Larignon *et al.,* 2009; Liminana *et al.,* 2009; Lorrain *et al.,* 2012; Bertsch *et al.,* 2013; Bruez *et al.,* 2013). This epidemic is often associated with the ban on the use of sodium arsenate in 2001 in Europe but GTDs have also progressed in countries where this pesticide has never been used, *e.g.* Germany, Switzerland, or in a very limited manner, *e.g.* Italy. Other factors are therefore involved. Abiotic factors such as climatic conditions (Sosnowski *et al.,* 2007), soil types (Mugnai *et al.,* 1999) and/or pruning practices (Armengol *et al.,* 2001; Valtaud *et al.,* 2009) may trigger or aggravate GTDs foliar expression. As regards the biotic factors, several fungi are associated with GTDs worldwide (Armengol *et al.,* 2001), including various Botryosphaeriaceae species. Those are important destructive pathogens that cause canker, dieback and fruit rot in grapevine and in other woody host plants; and that can result in plant mortality (Johnson *et al.,* 1991, 1993; Ramos *et al.,* 1991; Brown-Rytlewski and McManus 2000; Smith *et al.,* 2001; Slippers *et al.,* 2005; Damm *et al.,* 2007; Amponsah *et al.,* 2011; Thomidis *et al.,* 2011; Ni *et al.,* 2012; Bruez *et al.,* 2014). The infection can be diagnosed by the presence in the wood forming tissues of sectorial and/or central necrosis, and at the foliar level by discoloration and withering (Ben Ghnaya-Chakroun *et al.,* 2014). The predisposition of grapevine to Botryosphaeriaceae attacks can result from various elements such as mechanical injuries, mineral deficiencies and environmental factors (Slippers and Wingfield 2007; Ismail *et al.,* 2012). Amongst the Botryosphaeriaceae family, many species are linked to GTDs, *e.g. Lasiodiplodia theobromae* (*Botryodiplodia theobromae*) cause dead-arm and dieback disease in major crops with up to 500 plant hosts including grapevine (El-Goorani and El Meleigi 1972; Punithalingam 1980; Bester *et al.,* 2007; Ismail *et al.,* 2012; Abo rehab *et al.,* 2013; Tovar Pedraza *et al.,* 2013; Che *et al.,* 2015); and *Neofusicoccum parvum* (*Botryosphaeria parva*) that is one of the most virulent fungal species associated with GTDs (van Niekerk *et al.,* 2004; Laveau *et al.,* 2009; Úrbez-Torres and Gubler 2009). Several others fungi have been associated with GTDs, in particular three

basidiomycetes, *i.e Fomitiporia punctata* (Crous and Gams 2000; Armengol 2001;), *Fomitiporia mediterranea* (Mugnai *et al.,* 1999; Giovanni and Lorenzo 2006) and *Stereum hirsutum* (Crous and Gams 2000); and two ascomycetes, *i.e Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora* (Larignon and Dubos 1997; Mugnai *et al.,* 1999; Graniti *et al.,* 2001; Sparapano *et al.,* 2000, 2001a, 2001b).

In Tunisia, GTDs attacks on table grape cultivars have been recently reported by Ben Ghnaya-Chakroun *et al.* (2014) and Chebil *et al.* (2014). However, the situation in the vineyards and the knowledge on the pathogenic fungal species complex involved, are still relatively unknown. In that context, a survey was made to investigate whether GTDs were observed on Muscat d'Italie cultivar, being the most frequently planted in Tunisia. Pathogenic fungal strains were subsequently isolated from necrotic wood tissues of diseased grapevines and investigations were carried out on their (i) *in vitro* mycelial growth depending on the temperature, (ii) *in vitro* competition abilities and (iii) pathogenicity on Muscat d'Italie young vines.

Material and Methods

Field survey and sampling

Ten vineyards from the main grapevine production area of the Northern Tunisia were surveyed in summer 2013 to study the expression of GTDs-foliar symptoms. These vineyards (10 to 17 year-old) were located in four vine growing regions, *i.e* Borj El Amri, Cité El Mehrine, Medjez El Bab and Mornag, and planted with a table grapes cultivars, *i.e* Muscat d'Italie (Table 1). All the vineyards visited were trellised as single vines on a pergola system. They were irrigated with a drip irrigation system and protected under hail nets.

The cultivar Muscat d'Italie showed the characteristic GTDs decline symptoms (Figure 1). Five cordons were therefore randomly collected from mature vines that showed Esca-foliar symptoms (three from Mornag vineyards and two from Borj El Amri vineyards) and cut as described by Rezgui *et al.* (2016). From the inner part of each cordon, wood samples were taken from the necrotic and/or from non-necrotic (apparently healthy) tissues. They consisted in wood chips of around 5 mm in length.

Isolation and morphological identification of fungi

For each of the five vine cordons collected, 15 chips (around 5 mm in length) of wood tissues were sampled: five chips from necrotic tissues, five chips from non-necrotic tissues and five chips from the cordon ends (thin cordon that can't be cut longitudinally to determine the type of wood). In order to eliminate the epiphytic fungi, the wood fragments were surface-sterilized by immersion in 2.5% calcium hypochlorite solution for 30 s, and then rinsed in sterile distilled water. The disinfected chips

were dried on a sterile filter paper, plated onto MA medium (Biokar diagnostics, France), and then incubated at 25°C in the dark for 4 weeks. When fungal colonies emerged from the wood tissues, mycelial fragments were subcultured to fresh MA plates. In order to verify the efficacy of the surface disinfection, imprints of sample surfaces were made on MA plates and monitored for one week to confirm that no epiphytic fungi had grown (Hyde and Soytong 2008).

Fifty-eight fungal strains were recovered from the 75 wood pieces collected: 16 strains from the necrotic tissues, 26 from the non-necrotic tissues and 16 strains from the cordon ends. Whenever possible, the taxonomic identification of the recovered fungal strains was based on morphological and cultural features. Fifty-four strains were saprophytes and the four others, isolated from the necrotic tissues, belonged to three pathogenic species involved in GTDs according to the literature, *i.e Neofusicoccum parvum*, *Lasidiodiplodia pseudotheobromae* and *Schizophyllum commune*. The color and growth of those pathogenic isolates were recorded on MA medium after an incubation of three and seven days at 25 °C.

Identification of fungi by rDNA-ITS sequencing

The 16 strains isolated from the necrotic tissues were selected for molecular characterization. The strains were cultured onto MA plates at 25 °C for 7–10 days and the fresh mycelia were scraped at the surface of each plate with a sterile tip and then freeze-dried overnight (Alpha 1-4 LOplus, Bioblock Scientific). The dried mycelia were ground with a little glass ball in a TissueLyserII (Qiagen) before the DNA extraction with a classical CTAB procedure (Bruez *et al.*, 2014). The DNA extracts were then quantified with a nanodrop (ND-1000, Thermoscientific, Labtech) and homogenized at a concentration of 50 ng μL^{-1}.

DNA samples were sent to Beckman Coulter Genomics (Takeley, United Kingdom) for sequencing the internal transcribed spacer region (ITS) of the rDNA with the primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). For species level identification (>97% sequence similarity threshold), sequences were compared with the Genebank database by using the Blastn program (Altschul *et al.*, 1997).

Effect of the temperature on the *in vitro* mycelial growth of *L. pseudotheobromae*, *N. parvum* and *S. commune*

The effect of the temperature on the *in vitro* mycelial growth was assessed by placing a mycelium plug from the margin of a five-day-old culture of *L. pseudotheobromae*, *N. parvum* and *S. commune* in the center of a new MA plate. Plates were then incubated in the dark at 5-40°C in 5°C intervals with

14 plates per isolate and per temperature. The radial growth of each fungus was measured (in mm) after 24, 48, 72 and 96 h (Valtaud *et al.*, 2009; Ismail *et al.*, 2012).

In vitro competition between *L. pseudotheobromae*, *N. parvum* and *S. commune*

The *in vitro* competition between the three fungi was determined by placing mycelium plugs of each fungal strain (from the margin of five-day-old cultures) at equidistance (40 mm) onto MA plates. Seven treatments each containing 14 plates were tested at 25 °C and 30 °C for 72 h: (i) *N.P:* plates inoculated with *N. parvum,* (ii) *L.P*: plates inoculated with *L. pseudotheobromae,* (iii) *S.C*: plates inoculated with *S. commune* (iv) *N.P+L.P:* dual combination of *N. parvum* with *L. pseudotheobromae,* (v) *N.P+S.C*: dual combination of *N. parvum* with *S. commune,* (vi) *L.P+S.C*: dual combination of *L. pseudotheobromae* with *S. commune* and (vii) *N.P+L.P+S.C*: triple combination of *N. parvum* with *L. pseudotheobromae* and *S. commune.* The competition ability of each fungus was evaluated through the calculation of the space colonization (C%) by the method of Camporota (1985): C=(DT*100)/DE where DT is the distance traveled by a fungus on the axis connecting two mycelial discs after 72 h; and DE, the distance between two mycelial discs.

In planta pathogenicity assay

Grapevine material and experimental design

A total of 225 cuttings of cv. Muscat d'Italie were grown in a greenhouse in INRA precincts (Villenave d'Ornon, Bordeaux, France) where the air temperature (the average was 21°C) and the air relative humidity (the average was 66%) were measured during the period of incubation using Vaisala HMP 35C probes (Campbell Sci., Logan, UT). Nine treatments each applied on 25 plants were tested: i) C: not inoculated with the pathogenic fungi tested ii) CP: plants inoculated with sterile malt agar plugs, iii) *N.P*: plants inoculated with *N. parvum,* iv) *L.P*: plants inoculated with *L. pseudotheobromae,* v) *S.C*: plants inoculated with *S. commune,* vi) *N.P+L.P*: plants inoculated with *N. parvum* and *L. pseudotheobromae,* vii) *N.P+S.C*: plants inoculated with *N. parvum* and *S. commune,* viii) *L.P+S.C*: plants inoculated with *L. pseudotheobromae* and *S. commune* and ix) *N.P+L.P+S.C*: plants inoculated with *N. parvum, L. pseudotheobromae* and *S. commune.*

Inoculation of plants with pathogenic fungi

Before the inoculations (in June 2015), the stem of each plant was surface-disinfected with 95% ethanol, then, the center of each stem cutting, at the graft union, was artificially wounded by drilling a hole in the pith (4 mm diameter). The wound was then immediately filled with a mycelium plug excised from the margin of a fresh fungal MA culture, with the mycelium facing the cambium. In the case of

the co-inoculations with two or three fungal strains, the mycelium plugs were randomized at each cutting to avoid an inoculation effect. The treated wounds were then wrapped with parafilm for being protected during all the incubation period.

Wood necrosis measurement

After an incubation period of 120±5 days (October 2015), the bark was removed and the stem of each plant was cut longitudinally, and the percentage of the internal vascular lesions or necrosis in the cutting was recorded as described by Rezgui *et al.,* 2016.

Koch's postulates verification

In order to test the Koch's postulates, five wood chips were sampled in two different zones for each cutting: A = necrotic tissues, B= non-necrotic wood (Figure 2). For control cuttings, *i.e* C: not inoculated with the pathogenic fungi tested and CP: inoculated with sterile malt agar plugs, ten wood chips were sampled in zone B as no necrotic tissues were found. Thus, a total of 450 wood chips (ten chips per cutting x five cuttings x nine treatments) were collected, plated after disinfection onto MA medium and incubated at 25°C in the dark for seven days. Based on morphological features, 58 fungal strains corresponding to the three pathogenic species inoculated were recovered. Their DNA was extracted and sequenced according to the protocol previously described.

Statistical analyses

Data from the *in vitro* competition test and i*n planta* pathogenicity assay were analyzed using the statistical software R, version 3.2.2. The data were first subjected to the Shapiro-Wilks and Levene's tests to check the normality and equality of variances before being subsequently subjected to the non-parametric Kruskal-Wallis test or Student's t-test and the relative contrast effects analyzed by the nparcomp package (version 2.0).

Results

Foliar GTDs symptoms in the vineyards

In this survey, plants from the cultivar Muscat d'Italie showed foliar GTDs symptoms (Table 1). The symptoms observed were: chlorosis and necrosis of the leaves, stunted growth and darkening of the xylem vessels (Figure 1). These symptoms were typical of Esca-like foliar symptoms. Table 1 describes the characteristics of each vineyard. Great variations in the incidence of GTDs were recorded amongst vineyards (0.03% to 6%). The vineyards of the Mornag region showed the greatest disease incidence with percentages of symptomatic vines up to 6%.

Characterization of the fungal strains isolated from necrotic wood samples

A total of 16 fungal strains were recovered from the necrotic woody tissues sampled in Tunisian vine cordons. Table 2 illustrates the general features of the isolated fungi. Based on partial ITS genes sequence similarity, the fungal strains belonged to: *Alternaria* spp. (8 strains), *i.e Alternaria tenuissima* (*3), Alternaria alternata* (4) and *Alternaria mali (1); Acremonium strictum* (3); *Fusarium lateritium* (1); *Lasidiodiplodia pseudotheobromae* (1); *Neofusicoccum parvum* (1) and *Schizophyllum commune* (2). The last three species, known to be involved in GTDs, were isolated from the Mornag region whereas only saprophytic fungi were isolated from the Borj El Amri region.

Morphological characterization of *L. pseudotheobromae*, *N. parvum* and *S. commune*

Observation were made after three and seven days of incubation on MA at 25°C. The three pathogenic fungi tested had different aspects and colors, and mycelial growth rates. Indeed, *N. parvum* isolates (Figure 3 a1) were initially white, grew rapidly and formed a dense aerial mycelium that became dark gray. The reverse side of the colonies became an olive color, and finally passed to dark gray (Figure 3a2). *L. pseudotheobromae* colonies (Figure 3b1) grew rapidly, were initially grey-white and became dark grey-black (Figure 3b2). *S. commune* colonies (Figure 3c) grew slowly, were initially white and cottony; the reverse side of the colonies became yellow.

Effect of the temperature on the *in vitro* mycelial growth of *L. pseudotheobromae*, *N. parvum* and *S. commune*

The results obtained showed that the temperature and the incubation period affected the *in vitro* mycelial growth of the three pathogenic fungi. Whatever the incubation period, the optimal temperature for mycelial growth was 25°C for *N. parvum* (39.5 mm); and 30°C for *L. pseudotheobromae* (39.5 mm) and *S. commune* (15.6 mm) (Figure 4, Table 3).

The extremum temperatures tested, *i.e* 5°C and 40°C, inhibited the mycelial growth excepted for *S. commune* that were still able to develop at 40°C (Figure 4). That strain had a more limited mycelial growth in each condition tested compared to *N. parvum* and *L. pseudotheobromae* for which the measured mycelial diameters were at least three times bigger (Table 3).

It should also be noted that *N. parvum* and *L. pseudotheobromae* had a faster growth rate than *S. commune*. Both fungal strains reached their maximal growth after 3 days of incubation whether *S. commune* reached its maximum after 4 days (Figure 4).

In vitro competition between the three pathogenic fungi *L. pseudotheobromae*, *N. parvum* and *S. commune*

The results obtained in Figure 5 showed variable colonization percentages for the three fungal pathogens tested, *i.e L. pseudotheobromae* ($P < 0.05$), *N. parvum* ($P < 0.05$), and *S. commune* ($P < 0.05$) on dual and triple combination. Regarding *N. parvum* (Figure 5A), its mycelial growth was reduced by *L. pseudotheobromae* and *S. commune* when they were co-cultured in dual and/or triple combination after 72 h incubation at 25°C and/or 30°C. The inhibitory effect of *L. pseudotheobromae* (60%) and *S. commune* (20%) was not enhanced when both were co-cultured with *N. parvum* in the triple combination assay. The greatest inhibition was observed with *L. pseudotheobromae* in the dual competition test (*N. parvum* growth reduced by 60% compared to the control).

In the case of *L. pseudotheobromae* (Figure 5B), its growth was significantly affected ($P <0.05$) in presence of *N. parvum* (42%) and/or *S. commune* (22%) at 30°C. At 25°C, the growth of this fungus was inhibited only in presence of *N. parvum* in dual (42%) and/or triple combination (46%); whereas *S. commune* had an inhibitory effect only in the triple combination (22%).

For *S. commune* colonization, the results obtained showed that *L. pseudotheobromae* had an inhibitory effect in the double (14%, 17%) and/or triple (20%, 14%) combination assays at 25°C and 30°C (Figure 5C). *N. parvum* inhibited the growth of *S. commune* in the triple combination assays at 25°C and/or 30°C ($P<0.05$), whereas it had no effect ($P>0.05$) at 25°C and 30°C in the dual culture combinations.

L. pseudotheobromae, N. parvum and *S. commune* pathogenicity on young vines of cv. Muscat d'Italie

All the stem cutting cv. Muscat d'Italie artificially inoculated with the three pathogenic fungi, *i.e L. pseudotheobromae* (*L.P*), *N. parvum* (*N.P*) and *S. commune* (*S.C*), singly or in combination, exhibited internal necrotic lesions developed downward from the inoculation point at the end of the incubation period of 120 ±5 dpi (Figure 6). In the control cuttings (non inoculated with the pathogen), no lesion was observed.

Evaluation of the pathogenic potential of the fungal strains on cv. Muscat d'Italie showed significant variations depending on the isolates used ($P <0.05$). *N. parvum* caused the greatest damages as the necrosis rates were in the range of 80%, whereas those due to *L. pseudotheobromae* or *S. commune* were 2 to 2.5 times lower; they were respectively 32% and 35% (Figure 6). It should also be noted that the length of the stem necrosis also differed depending on the treatment ($P<0.05$), *i.e* if the pathogenic strains were inoculated alone or in combination. Indeed, *N. parvum* attack rates were reduced when the fungus was co-inoculated with *L. pseudotheobromae* (N.P+L.P - 32%) or *S. commune* (N.P+S.C - 31%) or both (N.P+L.P+S.C - 45%) compared to control cuttings inoculated only with *N. parvum* (80%). *N. parvum* did not however reduce the size of the necrosis induced by *L. pseudotheobromae* and/or *S. commune.*

The presence/persistence of the inoculated pathogenic fungi (Koch's Postulates) was assessed: 145 fungal strains were recovered from the 450 wood chips sampled in the nine treatments tested, *i.e* 87 saprophytic fungi and 58 pathogenic strains (29 *N. parvum*, 13 *L. pseudotheobromae* and 16 *S. commune*) (Table 4). Strains of the three pathogenic fungi. *L. pseudotheobromae, N. parvum* and *S. commune*, were all isolated from the necrotic tissues (zone A), whereas only saprophytic fungi, *e.g. Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., were isolated from the non-necrotic ones (zone B) (Table 4). The molecular characterization of the 58 pathogenic strains based on the rDNA-ITS sequencing confirmed their identification (Genebank >99% sequence similarity) and that they corresponded to the strains inoculated at the beginning of the assay (data not shown).

Discussion

The aim of this study was to gain a more comprehensive understanding of the extent of GTDs in Tunisian vineyards and to identify the pathogenic fungal species associated with Muscat d'Italie symptomatic grapevines.

In the survey made in ten table-grape vineyards, the cultivar Muscat d'Italie showed Esca-like foliar symptoms. Depending on the vineyards, symptomatic vines cv. Muscat d'Italie ranged from 0.03% to 6%. The highest percentages were obtained in the Mornag vine-growing region, suggesting thus that GTDs, *i.e* Esca, would, in the future, seriously impact vineyards longevity in that region. In the other regions, *i.e* Medjez El Bab, Borj El Amri and Cité El Mehrine, GTDs did not significantly affect the grapevines. This result is in agreement with Bruez *et al.* (2013) who reported that for a given variety, a different levels of disease is shown depending on the regions it is planted. These authors also highlighted significant differences between varieties in an epidemiological survey made in France. It is the case in the present study since the GTDs incidence differed between the Mornag region – where the foliar symptoms were the most frequent – and the three others.

Most research on GTDs has been focused on cultivars used for wine grape production (Bruez *et al.*, 2013; Haidar *et al.*, 2016; Yacoub *et al.*, 2016) but some studies indicate that table grape-cultivars are attacked as well, *e.g.* Red Globe and Victoria cultivars in Chile and South Africa (Auger *et al.*, 2004; Mutawila *et al.*, 2011; Morales *et al.*, 2012). To our knowledge, no data are available in the literature as regards Rich Baba Sam and Muscat d'Italie cultivars; their susceptibility to GTDs has to be demonstrated.

In the present study, cv. Muscat d'Italie display GTDs foliar symptoms. Three fungal species, known to be involved in GTDs according to the literature, *i.e Lasidiodiplodia pseudotheobromae, Neofusicoccum parvum* and *Schizophyllum commune* (Armengol *et al*., 2001; Fischer 2002), were

isolated from the necrotic tissues of vines cv. Muscat d'Italie and their identification was confirmed by the rDNA-ITS sequencing.

Many reports showed that *L. pseudotheobromae* belongs to the species of the Botryosphaeriaceae family linked to decline, canker and dieback of many crops, *i.e* maize (Diab *et al*., 1984), citrus (Abo-El-Dahab *et al*., 1992), sugar beet (Abd-El Ghani and Fatouh 2005), mango (Abdalla *et al*., 2003; Ismail *et al*., 2012) and grapevine worldwide (El-Goorani and El Meleigi 1972; Yan *et al*., 2013; Dissanayake *et al.,* 2015). According to Burgess *et al.* (2003), *L. theobromae* has to be regarded as a tropical and subtropical pathogen and cooler climates might prevent its establishment in such regions. This might explain why *L. pseudotheobromae* has been isolated in Tunisian vineyards characterized by semi-arid to arid climatic conditions with generally dry and hot summers and mild winters (Donat *et al.,* 2014). This phenomenon is of key importance and should also be linked to the incidence, virulence and symptoms on grapevines caused by Botryosphaeriaceae, including *L. pseudotheobromae*, that may differ from one cultivar and country to another (Alves *et al.,* 2008; Cai *et al.,* 2011; Ko-Ko *et al.,* 2011a, 2011b; Liu *et al.,* 2012).

N. parvum is one of the most virulent species associated with GTDs (Laveau *et al.,* 2009; Úrbez-Torres and Gubler 2009). This species has been frequently associated with internal and external wood necrosis in grapevine wood (Phillips 2002; Laveau *et al.,* 2009; Amponsah *et al.,* 2011). This pathogenic fungus is found in grapevine worldwide; *i.e* Australia, Chile, China, Egypt, Hungary, Italy, Lebanon, New Zealand, Portugal, South Africa, Spain, and USA (Baskarathevan *et al.,* 2011; Yan *et al.,* 2011a, 2011b, 2012, 2013). In France it was detected on mature grapevines of *Vitis vinifera* (Larignon *et al.,* 2001, 2009; Kuntzmann *et al.,* 2010; Bruez *et al.,* 2013); but also in young vines (3-6 years old) (Larignon *et al.* 2015). So, the great adaptation of *N. parvum* to various environmental conditions suggests that this pathogen may occur and attack grapevines under different climatic conditions, including in Tunisia.

S. commune is also among the fungi known to be involved in GTDs (Úrbez -Torres *et al.,* 2012); it causes wood disease of many other crops, *i.e* pistachio (Michailides *et al.,* 1995), olive tree (Úrbez-Torres *et al.,* 2013) and peach tree (Chen *et al.,* 2015).

The results of the present study support these earlier reports by showing that *L. pseudotheobromae, N. parvum* and *S. commune* also inhabit necrotic woody tissues of mature grapevines (10-17 years old) in Tunisia.

Numerous others pathogenic fungi not isolated in our experiment are also involved in GTDs: *Diplodia seriata ; Eutypa lata, Phaeomoniella chlamydospora, Fomitiporia mediterranea* and *Togninia minima*. (Taylor *et al.,* 2005; Savocchia *et al.,* 2007; Billones *et al.,* 2010; Úrbez-Torres

et al., 2007a, 2007b, 2010a, 2010b, 2012). Such result may be linked to climatic conditions that may differ from one cultivar and country to another and may influence the microbiota inhabiting grapevines.

Thus, to better understand the relationship between climatic conditions and the fungal strains isolated from Tunisian vines, the estimated temperature at which each isolated fungus reaches its maximum radial growth on *in vitro* synthetic medium was studied. The temperature was 25°C for *N. parvum* and 30°C for *S. commune* after 96 h of incubation, as already reported by Espinoza *et al.* (2009), Thomidis *et al.* (2011) and Teoh and Mat Don (2015). In the case of van Niekerk *et al.* (2004) and Ploetz *et al.* (2009) the *N. parvum* temperature optimum recorded was a bit higher; it was respectively 30ºC and 27.8ºC. The reasons for these discrepancies are unknown, but may reflect genetic differences between the isolates studied, geographical differences (Baskarathevan *et al.*, 2011), and/or a possible adaptation of the *N. parvum* strain to the Tunisian Mediterranean climate.

To our knowledge, no report has studied the temperature effect on the mycelial growth of *L. pseudotheobromae*, so it has to be investigated. In this assay, the maximum radial growth was obtained at 30°C and it was reduced at 10°C, 15°C and 40°C but not stopped. At 5°C, in contrast of *N. parvum* and S. *commune*, *L. pseudotheobromae* showed a slight growth.
L. pseudotheobromae, *N. parvum* and *S. commune* showed therefore their ability to grow under high temperatures (>30°C), which may suggest their adaptation to the Mediterranean climate in the north of Tunisia.

The pathogenicity of *L. pseudotheobromae*, *N. parvum* and *S. commune* was confirmed when these fungi were inoculated singly or in combination in the trunks of young Esca-free vines cv. Muscat d'Italie. All these fungi infected the vines through wounds, colonized and degraded the woody tissues, and caused internal disease symptoms. The symptoms severity, *i.e* the length of internal necrosis, differed depending on the fungal inocula applied ($P<0.05$): *N. parvum* caused the longest internal necrosis in cv. Muscat d'Italie. This result is in agreement with Úrbez-Torres and Gubler (2009) who reported that *L. theobromae, Neofusicoccum luteum, N. parvum,* and *N. australe* were more highly virulent than *D. seriata, D. mutila, Dothiorella iberica* and *D. viticola* in Californian vineyards.

It is also worth noting that in this *in planta* assay, a competitive effect between the three pathogens *L. pseudotheobromae*, *N. parvum* and *S. commune* was observed. It subsequently reduced the length of the internal necrosis caused by *N. parvum* when this fungus was inoculated with *L. pseudotheobromae* and/or *S. commune*. It may that these invading fungi are antagonistic in defending themselves and trying to exclude *N. parvum*. Likewise Sparapano *et al.* (2000a, 2001) reported a competitive association of *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora*, and a marked antagonistic effect of *Phaeoacremonium aleophilum* against *Fomitiporia punctata* during wood colonization.

In vitro confrontation assays between *L. pseudotheobromae, N. parvum* and *S. commune* on synthetic medium supported this result. Greater or lesser antagonistic effects were observed depending on the fungal combination applied ($P<0.05$) and/or the temperature of incubation ($P<0.05$). These discrepancies are unknown, but may be explain by the ability of fungi to produce antifungal compounds against themselves (Teoh and Mat Don 2015), and the temperature effect on their growth that would influence their antagonism capacity.

In conclusion, this study reported that, in the north of Tunisia, the table grape cultivar Muscat d'Italie was susceptible to GTDs attacks. Three pathogenic fungi *L. pseudotheobromae, N. parvum* and *S. commune* were isolated for the first time from necrotic woody tissues of this cultivar in the same area, the Mornag region. These pathogens reproduced typical internal symptoms of Esca on stem cuttings cv. Muscat d'Italie artificially inoculated. They were also systematically re-isolated from the necrotic zone (zone A) formed downward the inoculation point, whereas no pathogenic fungi (only saprophytes) where isolated from the non-necrotic tissues (zone B). The *N. parvum* strain was the more virulent when the length of the internal necrosis caused by each fungus was compared. An *in vitro* and *in planta* antagonistic effect was also reported that was influenced by the inoculum applied (strains alone or in combination) and/or the temperature of incubation. Thus, it seems that climatic conditions, including the Tunisian Mediterranean climate, may play a role in the microbiota inhabiting vineyards, in the susceptibility of cultivars and in the degree of virulence of GTDs attacks. Those results have to be deepened in further studies.

Acknowledgements

The authors are grateful to the program PHC-Utique France-Tunisie managed by CMCU (project 13G0924), the French Ministry of Agriculture, Food-processing industry and Forest (Casdar program V1302), the Poupelain Foundation and the International Organisation of Vine and Wine (OIV). We are grateful to Mokhtar Dridi (Laboratoire de Protection des végétaux, Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT) 2049, Ariana, Tunisia) for his help on sampling vines. We are also indebted to the INRA UMR SAVE technical staff, Gilles Taris and Sébastien Gambier, for their valuable help for the greenhouse and laboratory experiments.

Literature Cited

Abdalla M.A., M.H. Safie, M.M. El-Boghdady and H.H.M Soltan, 2003. Fruit coating with certain plant oils for controlling post-harvest diseases of mangoes with special reference to stem end rot. *Egyptian Journal of Applied Science* 18,116-136.

Abd-El Ghani H.S and H.M. Fatouh, 2005. First record of sugar beet root rot disease caused by *Botryodiplodia theobromae* in Egypt. *Egyptian Journal of Phytopathology* 33(1), 107-108.

Abo-El-Dahab M.K., S.A. El-Kazazz, A.A. Shoeib and M.A. El-Sheikh, 1992. Biochemical changes in citrus fruits infected with *Botryodiplodia theobromae*. *Journal of Agriculture Science Mansoura University* 17, 3525-3532.

Abo rehab M. E. A., A. K. M. Korra, M. A. M. Kamhawy and K. Y. A. Youssef, 2013. Fungal Species Associated with Graft Union on Grapevine, its Impact on Graft Failure Process and Attempted Solutions in Egypt. *International Journal of Agriculture Research* 3(2), 52-59.

Altschul S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D.J. Lipman, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.

Alves A., P.W. Crous, A. Correia and A.J.L. Phillips, 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae. Fungal Diversity* 28, 1-13.

Amponsah N.T., E.E. Jones, H.J. Ridgway and M.V. Jaspers, 2011. Identification, potential inoculum sources and pathogenicity of Botryosphaeriaceous species associated with grapevine dieback disease in New Zealand. *European Journal of Plant Pathology* 131, 467-482.

Armengol J., A. Vicent, L. Torné, F. García-Figueres and J. García-Jiménez, 2001. Fungi associated with Esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey. *Phytopathologia Mediterranea* 40, 325-329.

Auger J., M. Esterio, G. Ricke and I. Pérez, 2004: Black dead arm and basal canker of *Vitis vinifera* cv. Red Globe caused by *Botryosphaeria obtusa* in Chile. *Plant Disease* 88, 1286.

Baskarathevan J., V. Marlene, E. Jaspers, E. Jones and H.J. Ridgway, 2011. Incidence and distribution of Botryosphaeriaceous species in New Zealand vineyards. *European Journal of Plant Pathology* 132 (4), 549-560.

Ben Ghnaya-Chakroun A., A. Rezgui, J. Vallance, I. Kharoubi, M. Dridi, M.R. Hajlaoui, P. Rey and N. Sadfi-Zouaoui, 2014. First Molecular and Biochemical Characterization of *Phomopsis viticola* and *Diploidia seriata* two pathogens of Esca and black dead arm diseases of grapevine in the Northern region of the Tunisia. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3(8), 977-987.

Ben Salem A., Jemâa R., Gugerli P., Ghorbel A., 2000. Introduction and rehabilitation of vine in Tunisian Sahara. Bulletin de L'Organisation International du Vigne et du Vin, 574-580 pp.

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

Bester W., P.W. Crous and P.H. Fourie, 2007. Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against Botryosphaeria species. *Australasian Plant Pathology* 36, 73-77.

Billones R.G., H.J. Ridgway, E.E. Jones and M.V. Jaspers, 2010. First Report of *Neofusicoccum macroclavatum* as a Canker Pathogen of Grapevine in New Zealand. *Plant Disease* 94 (12), 1504.

Brown-Rytlewski D.E and P.S. McManus, 2000. Virulence of *Botryosphaeria dothidea* and *Botryosphaeria obtusa* on Apple and Management of Stem Cankers with Fungicides. *Plant Disease* 84, 1031-1037.

Bruez E., P. Lecomte, J. Grosman, B. Doublet, C. Bertsch, F. Fontaine, J.P. Da Costa, A. Ugaglia, P.L. Teissedre, L. Guerin-Dubrana and P. Rey, 2013. Overview of grapevine trunk diseases in France in the 2000s. *Phytopathologia Mediterranea* 52, 262-275.

Bruez E., J. Vallance, J. Gerbore, P. Lecomte, J.P. Da Costa, L. Guerin-Dubrana and P. Rey, 2014. Analyses of the Temporal Dynamics of Fungal Communities Colonizing the Healthy Wood Tissues of Esca Leaf-Symptomatic and Asymptomatic Vines. *Plos one* 9, e95928.

Burgess T., M.J. Wingfield and B.D. Wingfield, 2003. Development and characterization of microsatellite loci for the tropical tree pathogen *Botryosphaeria rhodina*. *Molocular Ecology Notes* 3, 91-94.

Cai L., T. Giraud, N. Zhang, D. Begerow, G.H. Cai and R.G. Shivas, 2011. The evolution of species concepts and species recognition criteria in plant pathogenic fungi. *Fungal Diversity* 50,121-123.

Camporota P., 1985. Antagonisme *in vitro* de *Trichoderma spp*. vis-à vis de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agronomy Journal* 5 (7), 613-620.

Che J., B. Liu, C. Ruan, J. Tang and D. Huang, 2015. Biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae*, which causes black spot disease of harvested wax apple fruit, using a strain of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX. *Crop Protection Journal* 67, 178-183.

Chebil S., R. Fersi, A. Yacoub, S. Chenenaoui, I. Melki, Z. Zemni, A. Rhouma, G. Durante and A. Mliki, 2014. First report of *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata* and *Neofusicoccum luteum* associated with canker and dieback of grapevines in Tunisia. *Plant Disease* 98, 3-420.

Chen C., C.H. Bock, M.H. Hotchkiss, M.M. Garbeletto and T.E. Cottrell, 2015. Observation and identification of wood decay fungi from the heartwood of peach tree limbs in central Georgia, USA. *European Journal of Plant Pathology* 143, 11-23.

Compant S., G. Brader, S. Muzammil, A. Sessitsch, A. Lebrihi and F. Mathieu, 2013. Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. *Biological Control* 58, 435-455.

Crous P.W and W. Gams, 2000. *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri Grapevine decline and Esca. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 112-118.

Damm U., P.W. Crous and P.H. Fourie, 2007. Botryosphaeriaceae as potential pathogens of Prunus species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia* 99(5), 664-680.

Diab M.M., I. Kahlil, N.A. Dawood and E.M. El-Assiuty, 1984. Ear and grain rot of maize caused by *Botryodiplodia theobromae* pathogens in Egypt. *Minufiya Journal of Agricultural Research* 9,129-138.

Dissanayake A.J., W. Zhang, L. Mei, E. Chukeatirote, J.Y. Yan, X.H. Li and K.D. Hyde, 2015. *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causes pedicel and peduncle discoloration of grapes in China. *Australasian Plant Disease Notes* 10, 21.

Donat M.G., T.C. Peterson, M. Brunet, A. D. King, M. Almazroui, R. K. Kolli, D. Boucherf, A.Y. Al-Mulla, A.Y. Nour, A.A. Aly, T.A. Ali Nada, M.M. Semawi, H.A. Al Dashti, T.G. Salhab, K.I. El Fadli, M.K. Muftah, S. Dah Eida, W. Badi, F. Driouech, K. El Rhaz, M.J.Y. Abubaker, A.S. Ghulam, A. Sanhouri Erayah, M. Ben Mansour, W.O. Alabdouli, J.S. Al Dhanhaniw and M.N. Al Shekailiw, 2014. Changes in extreme temperature and precipitation in the Arab region: long-term trends and variability related to ENSO and NAO. *International Journal of Climatology* 34, 581-592.

El-Goorani M.A and M.A. El Meleigi, 1972. Dieback of grapevine by *Botryodiplodia theobromae* Pat. in Egypt. *Phytopathologia Mediterranea* 11, 210-211.

Espinoza J. G., E. X. Briceño, E. R. Chávez, J. R. Úrbez-Torres and B. A. Latorre, 2009. *Neofusicoccum* spp. Associated with Stem Canker and Dieback of Blueberry in Chile. *Plant Disease* 93 (11), 1187-1194.

Fischer M., 2002. A new wood decaying basidiomycete species associated with Esca of grapevine : *Fomitiporia mediterranea. Mycological Progress* (1), 315-324.

Graniti A., L. Sparapano and G. Bruno, 2001. Alcuni progressi degli studi sulla patogenesi del ‘‘mal dell’Esca’’ e delle ‘‘venature brune del legno’’della vite. *Inf Fitopat* 51(5), 13-21.

Giovanni B. and S. Lorenzo, 2006. Effects of three Esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: III. Enzymes produced by the pathogens and their role in fungus-to-plant or in fungus-to-fungus interactions. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 69 (4-6), 182-194.

Haidar R., A. Deschamps, J. Roudet, C. Calvo-Garrido, E. Bruez, P. Rey and M. Fermaud, 2016. Multi-organ screening of efficient bacterial control agents against two major pathogens of grapevine. *Biologiacal Control* 92, 55-65.

Hyde K.D and K. Soytong, 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* 33,163-173.

Ismail A., M.G. Cirvilleri, G. Polizzi, P. W. Crous, J. Z. Groenewald and L. Lombard, 2012. *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. *Australasian Plant Pathology* 41, 649-660.

Johnson G.I., A.W. Cooke, A.J. Mead and I.A. Wells, 1991. Stem end-rot of mango in Australia: causes and control. *Acta Horticulturae* 219, 288- 295.

Johnson G.I., T. Cooke and A. Mead, 1993. Infection and quiescent of mango stem-end rot pathogens. *Acta Horticulturae* 341, 329-336.

Ko-Ko T.W., S.L. Stephenson, A.H. Bahkali and K.D. Hyde, 2011a. From morphology to molecular biology: can we use sequence data to identify fungal endophytes? *Fungal Diversity* 50, 113-120.

Ko-Ko T.W., S.L. Stephenson, K.D. Hyde and S. Lumyong, 2011b. Influence of seasonality on the Occurrence of Myxomycetes. *Chiang Mai Journal of Sciences* 38, 71-84.

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

Larignon P. and B. Dubos, 1997. Fungi associated with Esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 103,147-157.

Larignon P., R. Fulchic, L. Cere and B. Dubos, 2001. Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S336-S342.

Larignon P., F. Fontaine, S. Farine, C. Clément and C. Bertsch, 2009. Esca et Black Dead Arm : deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la Vigne. *Comptes Rendus Biologies* 332, 765-783.

Larignon P., A. Spagnolo, C. Bertsch and F. Fontaine, 2015. First report of young grapevine decline caused by *Neofusicoccum parvum* in France. *Plant Disease* 99 (12), 1859.

Laveau C., A. Letouze, G. Louvet, S. Bastien and L. Guerin-Dubrana, 2009. Differential aggressiveness of fungi implicated in Esca and associated diseases of grapevine in France. *Phytopathologia Mediterranea* 48, 32-46.

Liminana J. M., G. Pacreau, F. Boureau, E. Menard, S. David, C. Himonnet, M. Fermaud, J. P. Goutouly, P. Lecomte and V. Dumot, 2009. Inner necrosis in a grapevine rootstock vineyard in the Cognac area (Charentes, France). *Phytopathologia Mediterranea* 48, 92-100.

Liu J.K., R. Phookamsak, M. Doilom, S. Wikee, Y.M. Li, H. Ariyawansha, S. Boonmee, P. Chomnunti, D.Q. Dai, J.D. Bhat, A.I. Romero, W.Y. Zhuang, J. Monkai, E.B.G. Jones, E. Chukeatirote, T.W. Ko Ko, Y.C. Zhao, Y. Wang and K.D. Hyde, 2012. Towards a natural classification of Botryosphaeriales. *Fungal Diversity* 57, 149-210.

Lorrain B., I. Ky, G. Pasquier, M. Jourdes, L.G. Dubrana, L. Gény, P. Rey, B. Donèche and P.L. Teissedre, 2012. Effect of Esca disease on the phenolic and sensory attributes of Cabernet Sauvignon grapes, musts and wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 18, 64-72.

Michailides T.J., D.P. Morgan and M.A. Doster, 1995. Diseases of pistachio in California and their significance. ISHS Acta Horticulturae 419: I International Symposium on Pistachio. *Acta Horticulturae* 419, 56.

Morales A., B.A. Latorre, E. Piontelli and X. Besoain, 2012. Botryosphaeriaceae species affecting table grape vineyards in Chile and cultivar susceptibility. *Ciencia e investigación agraria* 39(3), 445-458.

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, 404-18.

Mutawila C., P.H. Fourie, F. Halleen and L. Mostert, 2011. Grapevine cultivar variation to pruning wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 50, S264-S276.

Ni H.F., H.R. Yang, R.S. Chen, R.F. Liou and T.H. Hung, 2012. New Botryosphaeriaceae fruit rot of mango in Taiwan: identification and pathogenicity. *Botanical Studies* 53, 467-478.

Phillips A. J. L., 2002. Botryosphaeria species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia mediterranea* 41, 3-18.

Ploetz R. C., J. M. Pérez-Martínez, A. J. Palmateer and T. L. Tarnowski, 2009. Influence of Temperature, Light Intensity, and Isolate on the Development of *Neofusicoccum parvum*–induced Dieback of *Eugenia, Syzygium paniculatum*. *Plant Disease* 93, 804-808.

Punithalingam E., 1980. *Plant diseases attributed to Botryodiplodia theobromae Pat (Bibliotheca mycological). J. Carmer.* Vaduz. 123 pp. ISBN 3-7682-1256-4 .Record Number: 19801362832.

Ramos L.J., S.P. Lara, R.T. McMillan and K.R. Narayanan, 1991. Tip die back of mango (*Mangifera indica*) caused by *Botryosphaeria ribis*. *Plant Disease* 75, 315-318.

Rezgui A., A. Ben Ghnaya-Chakroun, J. Vallance, E. Bruez, M.R. Hajlaoui, N. Sadfi-Zouaoui and P. Rey, 2016. Endophytic bacteria with antagonistic traits inhabit the wood tissues of grapevines from Tunisian vineyards. *Biological Control* 99, 28-37.

Savocchia S., C.C. Steel, B.J. Stodart and A. Somers, 2007. Pathogenicity of *Botryosphaeria* species isolated from declining grapevines in sub tropical regions of Eastern Australia. *Vitis* 46, 27-32.

Slippers B., G.I. Johnson, P.W. Crous, T.A. Coutinho, B. Wingfield and M.J. Wingfield, 2005. Phylogenetic and morphological revolution of the *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica*. Mycologia 97(1), 99-110.

Slippers B and M.J. Wingfield, 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews, Fungal Endophytes* 21, 90-106.

Smith H., P.W. Crous, M.J. Wingfield, T.A. Coutinho and B.D. Wingfield, 2001. *Botryosphaeria eucalyptorum* sp. nov., a new species in the *B. dothidea*-complex on Eucalyptus in South Africa. *Mycologia* 93(2), 277-285.

Sparapano L., G. Bruno, C. Ciccarone and A. Graniti, 2000. Infection of grapevines by some fungi associated with Esca. I. *Fomitiporia punctata* as a wood-rot inducer. *Phytopathologia Mediterranea* 39, 46-52.

Sparapano L., G. Bruno and A. Campanella, 2001a. Interactions between associated fungi with Esca of grapevine, and their secondary metabolites. *Phytopathologia Mediterranea* 40, 417-22.

Sparapano L., G. Bruno and A. Graniti, 2001b. Three-year observation of grapevines cross-inoculated with Esca-associated fungi. *Phytopathologia Mediterranea* 40, S376 -S386.

Steel C.C., J.W. Blackman and L.M. Schmidtke, 2013. Grapevine Bunch Rots: Impacts on Wine Composition, Quality, and Potential Procedures for the Removal of Wine Faults. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 61, 5189-5206.

Sosnowski M.R., D. Shtienberg, M.L. Creaser, T.J. Wicks, R. Lardner and E.S. Scott, 2007. The influence of climate on foliar symptoms of Eutypa dieback in grapevines. *Phytopathology* 97, 1284-1289.

Taylor A., G.E. Hardy, P. Wood and T. Burgess, 2005. Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine decline in Western Australia. *Australian Plant Pathology* 34, 187-195.

Teoh Y.P and M. Mat Don, 2015. Effect of Temperature on *Schizophyllum commune* Growth and 4H-pyran-4-one, 2, 3-dihydro-3, 5-dihydroxy-6-methyl- Production using a Bubble Column Bioreactor. *Chiang Mai Journal of Sciences* 42(3), 539-548.

Thomidis T., T.J. Michailides and E. Exadaktylou, 2011. *Neofusicoccum parvum* associated with fruit rot and shoot blight of peaches in Greece. *European Journal of Plant Pathology* 131,661-668.

Tovar Pedraza, J.M., J.A. Mora Aguilera, C. Nava Diaz, D. Teliz Ortiz, A. Villegas Monter and S.G. Leyva Mir, 2013. Control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of dieback of sapote

mamey [Pouteria sapota (Jacq.) H. E. Moore and Steam] grafts in mexico. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36, 233-238.

Úrbez-Torres J.R., G.M. Leavitt, J.C. Guerrero, J. Guevara, K. Striegler and A. Allen, 2007a. Identification of fungal pathogens associated with grapevine cankers in the main grape-growing areas of the United States and Mexico. *Phytopathologia Mediterranea* 46, 109-110.

Úrbez-Torres J.R., J. Luque and W.D. Gubler, 2007b. First report of *Botryosphaeria iberica* and *B. viticola* associated with grapevine decline in California. *Plant Disease* 91,772.

Úrbez-Torres J.R and W.D. Gubler, 2009. Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Disease* 93, 584-592.

Úrbez-Torres J.R., S. Rooney-Latham and W.D. Gubler, 2010a. First Report of *Diplodia corticola* Causing Grapevine (*Vitis vinifera*) Cankers and Trunk Cankers and Dieback of Canyon Live Oak (*Quercus chrysolepis*) in California. *Plant Disease* 94, 785.

Úrbez-Torres J.R., M. Battany and L.J. Bettiga, 2010b. Botryosphaeriaceae species spore-trapping studies in California vineyards. *American Phytopathological Society* 94, 717-724.

Úrbez-Torres J.R., F. Peduto, R.K. Striegler, K.E. Urrea-Romero, J.C. Rupe, R.D. Cartwright and W.D. Gubler, 2012. Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk disease in Arkansas and Missouri. *Fungal Diversity* 52 (1), 169-189.

Úrbez-Torres J. R., F. Peduto, P. M. Vossen, W. H. Krueger and W. D. Gubler, 2013. Olive Twig and Branch Dieback: Etiology, Incidence, and Distribution in California. *Plant Disease* 97 (2), 231-244.

Van Niekerk J.M., P.W. Crous, J.Z.E. Groenewald, P.H. Fourie and F. Halleen, 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96, 781-798.

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

White T., Birns T., Lee S., Taylor J., 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. Academic Press, 315-322 pp.

Yacoub A., J. Gerbore, N. Magnin, P. Chambon, M.C. Dufour, M.F. Corio-Costet, R. Guyoneaud and P. Rey, 2016. Ability of *Pythium oligandrum* strains to protect *Vitis vinifera L.*, by inducing plant resistance against *Phaeomoniella chlamydospora*, a pathogen involved in Esca, a grapevine trunk disease. *Biological control* 92,7-16.

Yan J.Y., X.H. Li, F.F. Kong, Z.Y. Wang, L.Z. Gong and H.P. He, 2011a. Occurrence of grapevine trunk disease caused by *Botryosphaeria rhodina* in China. *Plant Disease* 95, 219.

Yan J.Y., Y.L. Peng, Y. Xie, X.H. Li, S.W. Yao, M.L. Tang and Z.Y. Wang, 2011b. First Report of Grapevine Trunk Disease Caused by *Botryosphaeria obtusa* in China. *Plant Disease* 95, 616.

Yan J.Y., Y. Xie, S.W. Yao, Z.Y. Wang and X.H. Li, 2012. Characterization of *Botryosphaeria dothidea*, the causal agent of grapevine canker in China. *Australian Plant Pathology* 41(4), 351-357.

Yan J.Y., Y. Xie, W. Zhang, Y. Wang, J.K. Liu, K.D. Hyde, R.C. Seem, G.Z. Zhang, Z.Y. Wang, S.W. Yao, X.J. Bai, A.J. Dissanayake, Y.L. Peng and X.H. Li, 2013. Species of Botryosphaeriaceae involved in grapevine dieback in China. *Fungal Diversity* 61, 221-236.

Zoghlami N., A. Mliki and A. Ghorbel, 2001. Evaluation of genetic diversity among Tunisian grapevines by RAPD markers. *Vitis* 40(1), 31-37.

Zoghlami N., L. Riahi, V. Laucou, T. Lacombe, A. Mliki, A. Ghorbel and P. This, 2009. Origin and genetic diversity of Tunisian grapes as revealed by microsatellite markers. *Scientia Horticulturae* 120, 479-486.

Table1. Muscat d'Italie vineyards surveyed for GTDs in the northern Tunisian vine growing regions.

Vine growing regions	Vineyards	Age of the Cultivars in 2013	Rootstocks	Areas/ Number of vines	Disease incidence
Mornag	Mornag	15 years	P1103	2 hectares 2500 vines	6%
	Sidi Sâad	10 years	P1103	3 hectares 4500 vines	0.33%
	Kheledia	17 years	P1103	1 hectare 1200 vines	1.66%
	Zawiyet Mornag	15 years	P1103	5 hectares 6000 vines	3%
Medjez El Bab	V1	14 years	P1103	1 hectare 1275 vines	0%
	V2	13 years	P1103	2 hectares 1700 vines	0.06%
Cité El Mehrine	V3	12 years	P1103	1hectare 1275 vines	0%
	V4	14 years	P1103	0.5 hectare 637 vines	0%
Borj El Amri	V5	15 years	P1103	2 hectares 2550 vines	0.03%
	V6	13 years	P1103	1 hectare 1275 vines	0.3%

Table 2. Origin and molecular identification of the fungal strains isolated from necrotic tissues of Muscat d'Italie cultivar.

Strains	Sampling Site	Molecular Identification	GenBank reference accession number (ITS)
F15	Borj El Amri	*Alternaria tenuissima*	(JN542519.1, 100%)
F17	Borj El Amri	*Alternaria alternata*	(FJ228163.1, 99%)
F33	Borj El Amri	*Alternaria tenuissima*	(JN542519.1, 100%)
F34	Borj El Amri	*Alternaria. Alternata*	(KC692221.1, 99%)
F35	Borj El Amri	*Alternaria alternata*	(AY154682.1, 100%)
F36	Borj El Amri	*Alternaria. Alternata*	(FJ228163.1, 99%)
F39	Borj El Amri	*Acremonium strictum*	(EU497953.1, 99%)
F41	Mornag	***Schizophyllum commune***	**(**KJ093499.1, 99%)
F42	Mornag	***Schizophyllum commune***	**(**FJ478109.1, 99%)
F46	Mornag	*Fusarium lateritium*	(GU480949.1, 99%)
F47	Mornag	***Lasidiodiplodia pseudotheobromae***	**(**GQ469969.1, 100%)
F48	Mornag	***Neofusicoccum parvum***	(JQ647911, 99%)
F50	Mornag	*Alternaria mali*	(AY154683.1, 100%)
F51	Mornag	*Acremonium strictum*	(EU497953.1, 99%)
F53	Mornag	*Acremonium strictum*	(EU497953.1, 99%)
F58	Mornag	*Alternaria tenuissima*	(KP942908.1, 99%)

Table 3. Mycelial growth of *L. pseudotheobromae*, *N. parvum* and *S. commune* after 96 hours of incubation at various temperatures. Calculations were made in the linear phase of the mycelial growth and are the mean of 14 values (replicates made per strain and per condition tested).

Temperatures °C	**Mean of radial mycelial growth ±(SE) (mm)**		
	N. parvum	***L. pseudotheobromae***	***S. commune***
5	0.00±0.00	0.96±1.04	0.04±0.13
10	2.23±0.24	2.29±0.70	1.57±0.35
15	25.60±3.66	16.00±1.99	2.96±0.25
20	39.40±0.51	39.50±0.00	9.52±0.35
25	39.50±0.00	39.50±0.00	12.90±0.62
30	39.50±0.00	39.50±0.00	15.60±0.94
35	2.73±0.55	37.00±2.47	11.60±0.84
40	0.00±0.00	0.61±0.14	6.43±0.25

Table 4. Number of fungal strains per treatment and zone of isolation. Zone A= necrotic woody tissues, zone B= non-necrotic wood, *L.P=Lasidiodiplodia pseudotheobromae*, *N.P=Neofusicoccum parvum*, *S.C=Schizophyllum commune.*

	Zone A				**Zone B**			
Treatments	***N.P***	***L.P***	***S.C***	**Others**	***N.P***	***L.P***	***S.C***	**Others**
N.P	25	0	0	0	0	0	0	4
L.P	0	10	0	2	0	0	0	7
S.C	0	0	4	1	0	0	0	1
N.P+L.P	1	1	0	5	0	0	0	3
N.P+S.C	3	0	3	3	0	0	0	1
L.P+S.C	0	2	5	3	0	0	0	3
N.P+L.P+S.C	0	0	4	4	0	0	0	4
C	-	-	-	-	0	0	0	23
CP	-	-	-	-	0	0	0	23
Total	29	13	16	18	0	0	0	69

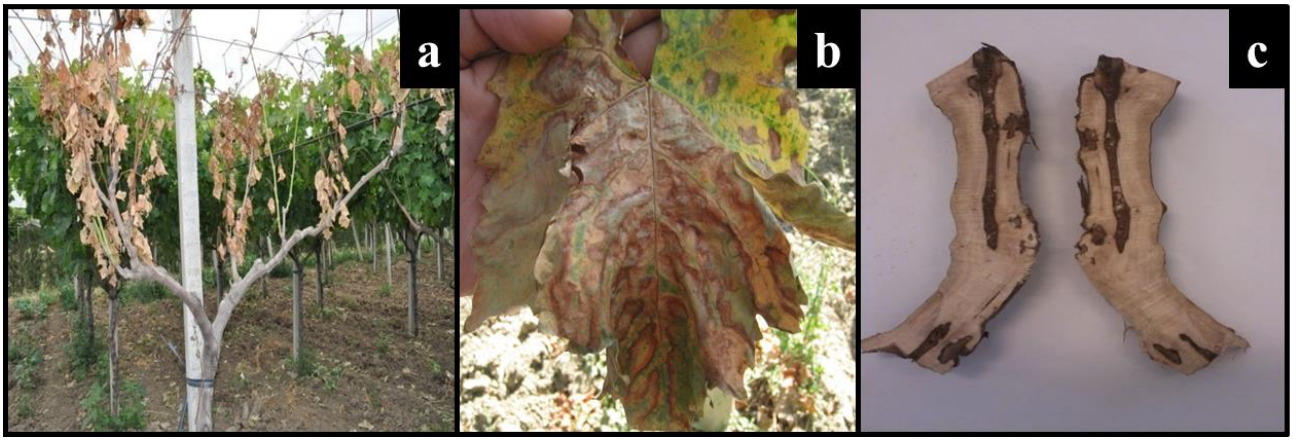

Figure 1. The different GTDs symptoms observed in Mornag vineyards. Apoplectic form (a), Esca-foliar symptoms (b) and Central necrosis (c).

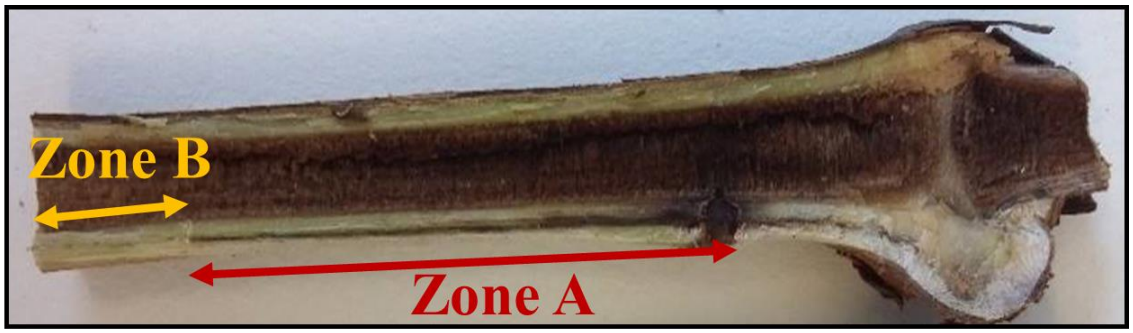

Figure 2. Zones of isolation of fungi to test the Koch's postulates: zone A= necrotic tissues, zone B= non-necrotic woody tissues.

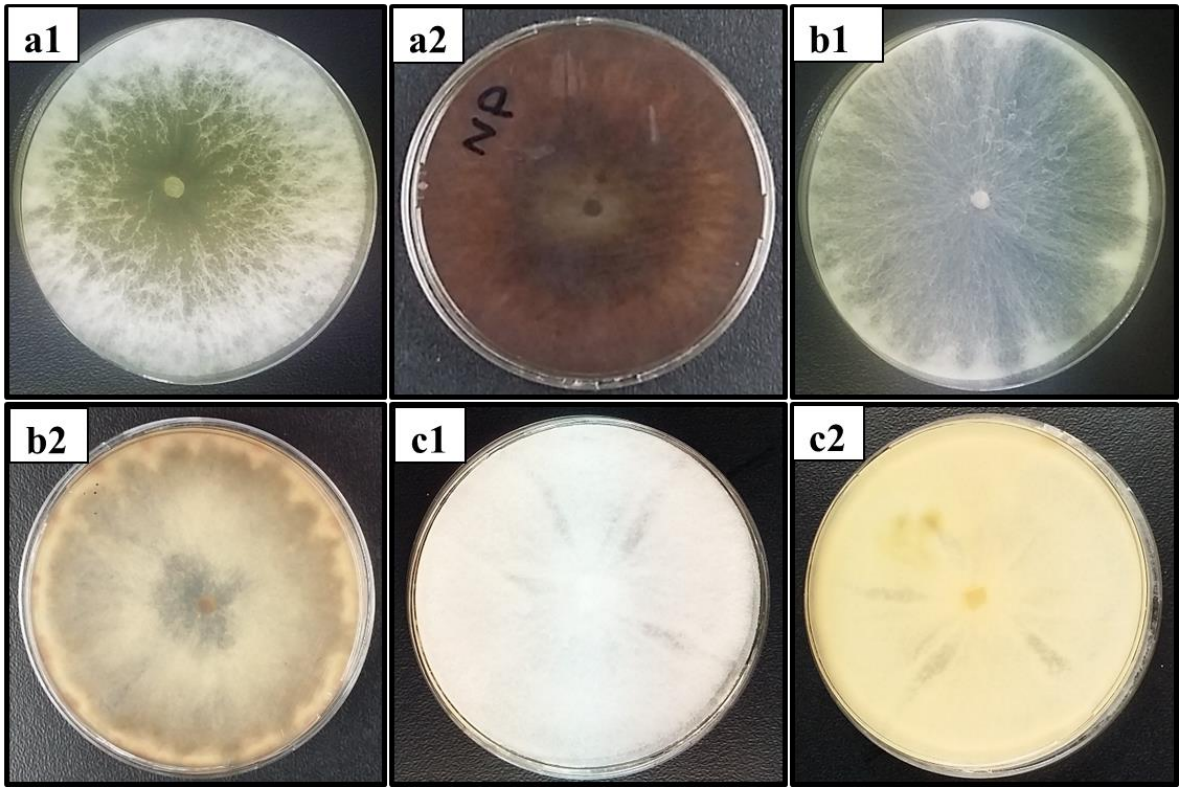

Figure 3. Morphological appearance of *N. parvum* (a), *L. pseudotheobromae* (b) and *S. commune* (c) on MA after 3 (a1, b1, c1) and 7 days (a2, b2, c2) of incubation at 25°C.

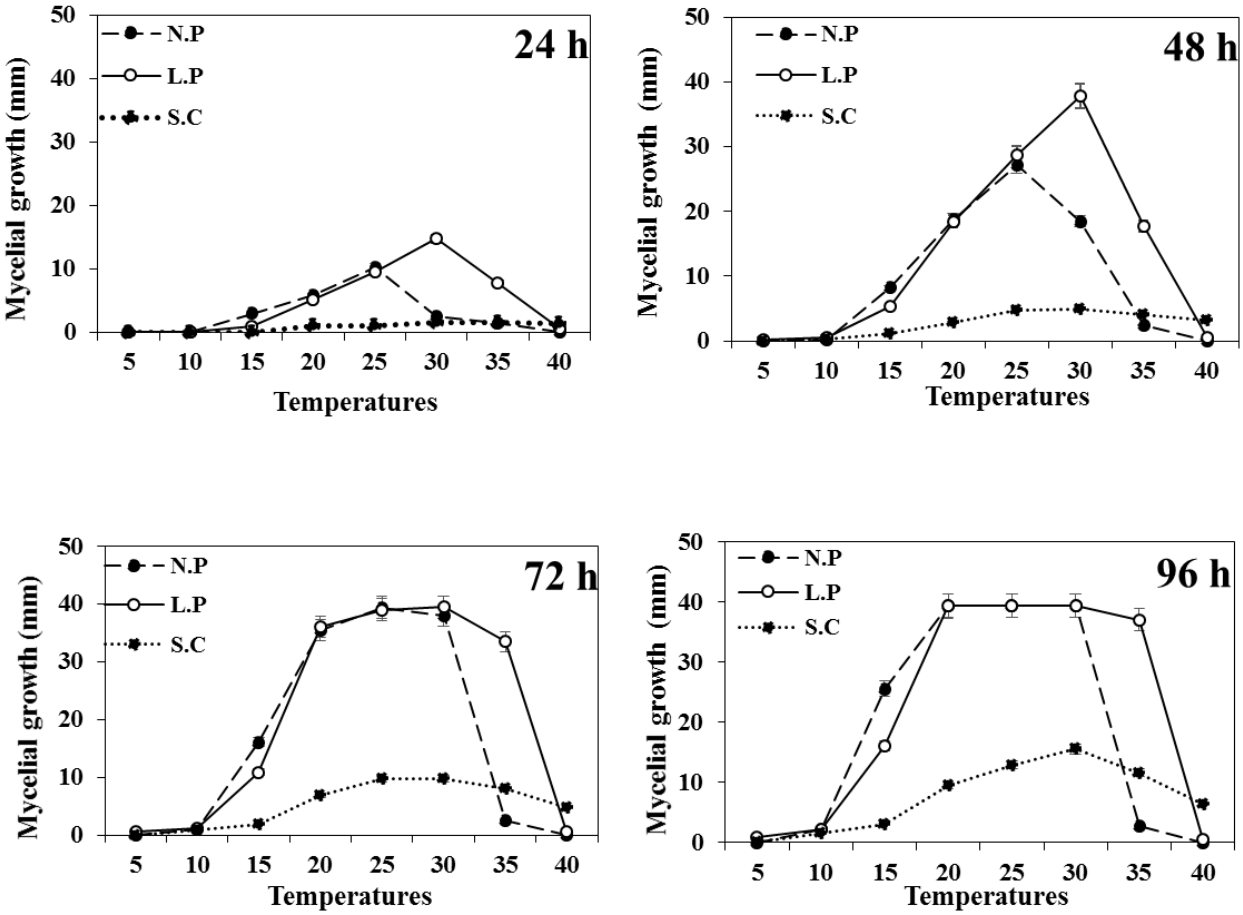

Figure 4. Effect of the temperature on the mycelial growth (in mm) of *L. pseudotheobromae* (L.P), *N. parvum* (N.P) and *S. commune* (S.C) after 24, 48, 72 and 96 hours of incubation. Each point is the mean of 14 values (replicates made per strain and per condition tested). Error bars show the 95% confidence intervals.

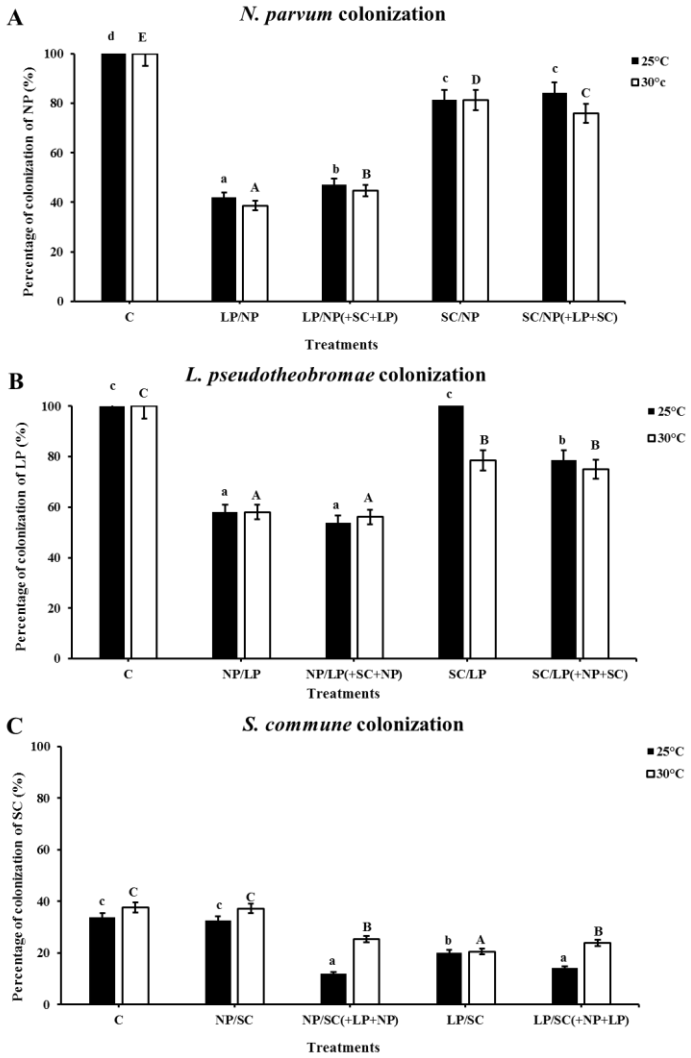

Figure 5. *In vitro* competition (% colonization) between A, *N. parvum* (NP); B, *L. pseudotheobromae* (LP)*;* and C, *S. commune* (SC) after 72 hours of incubation on MA. C: control, *i.e N. parvum*, *L. pseudotheobromae* and *S. commune* alone, LP/NP: effect of LP on NP in double combination, SC/NP: effect of SC on NP in double combination, LP/NP (+SC): effect of LP on NP in triple combination, SC/NP (+LP): effect of SC on NP in triple combination, NP/LP: effect of NP on LP in double combination, SC/LP: effect of SC on LP in double combination, NP/LP (+SC): effect of NP on LP in triple combination, SC/LP (+NP): effect of SC on LP in triple combination, NP/SC: effect of NP on SC in double combination, LP/SC: effect of LP on SC in double combination, NP/SC (+LP): effect of NP on SC in triple combination, and LP/SC (+NP): effect of LP on SC in triple combination. Percentage values are the mean of 14 measures per treatment. Mean values sharing the same uppercase or lowercase letters are not significantly different according to the Kruskal-Wallis' non-parametric relative contrast effects post-hoc test at $P<0.05$. Error bars show the 95% confidence intervals.

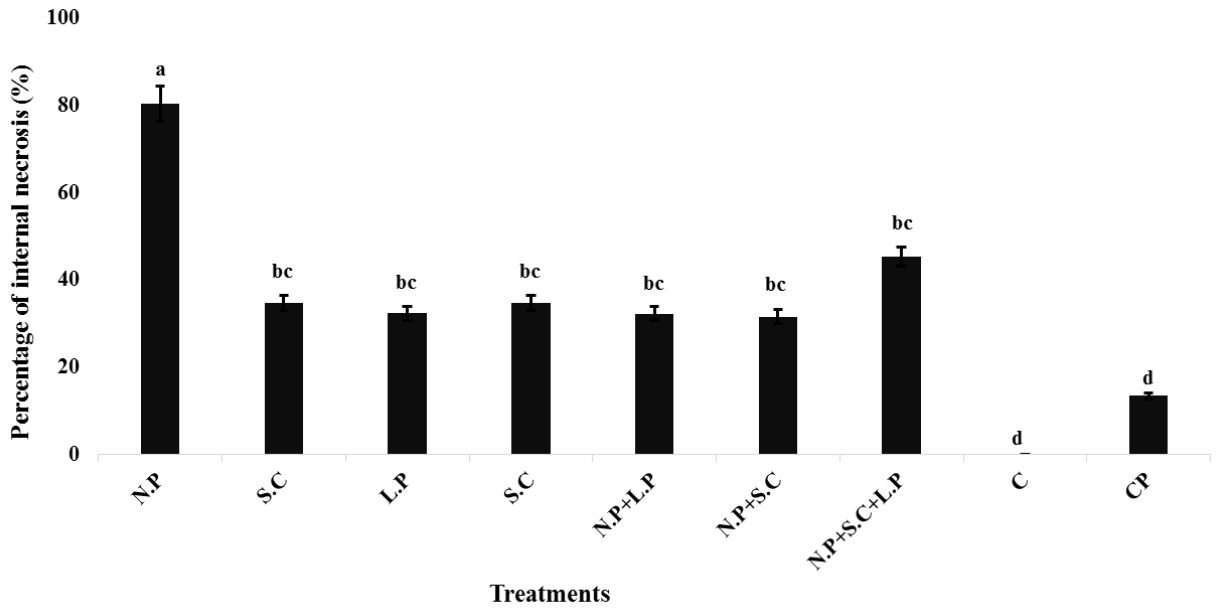

Figure 6. Internal necrosis induction by *L. pseudotheobromae* (*L.P*), *N. parvum* (*N.P*) and *S. commune* (*S.C*) on young vines cv. Muscat d'Italie under greenhouse conditions. Percentage values are the mean of 25 measures per treatment. Mean values sharing the same letters are not significantly different according to the Kruskal-Wallis' non-parametric relative contrast effects post-hoc test at $P<0.05$. C: control cuttings not inoculated with the fungus, CP: control cuttings inoculated with sterile malt agar plugs. Error bars show the 95% confidence intervals.

Valorisation des résultats
Participations scientifiques

Valorisation des résultats

1. Publication internationale à comité de lecture

-Asma BEN GHNAYA-CHAKROUN, **Awatef REZGUI**, Jessica VALLANCE, Ines KHAROUBI, Mokthar DRIDI, Mohamed Rabeh HAJLAOUI, Patrice REY et Najla SADFIZOUAOUI, 2014. First molecular and biochemical characterization of *Phomopsis viticola* and *Diplodia seriata* two pathogens of esca and black dead arm diseases of grapevine in the Northern region of the Tunisia . *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* 3(8):977-987.

-Awatef REZGUI, Asma BEN GHNAYA-CHAKROUN, Jessica VALLANCE, Emilie BRUEZ, Mohamed Rabeh HAJLAOUI, Najla SADFI-ZOUAOUI et Patrice REY, 2016. Endophytic bacteria with antagonistic traits inhabit the wood tissues of grapevines from Tunisian vineyards *Biological Control.* 99, 28-37.

-Awatef REZGUI, Jessica VALLANCE, Asma BEN GHNAYA-CHAKROUN, Patrice REY et Najla SADFI-ZOUAOUI, 2016. First report of *Lasidiodiplodia pseudotheobromae*, *Neofusicoccum parvum* and *Schizophyllum commune*, three fungi associated with Grapevine wood diseases (GTDs) in the Northren region of Tunisia. En cours de rédaction.

-Awatef REZGUI, Jessica VALLANCE, Asma BEN GHNAYA-CHAKROUN, Emilie BRUEZ, Mayssa ARFAOUI, Najla SADFI-ZOUAOUI et Patrice REY, 2016. Ability of two bacterial strains *Bacillus subtilus* and *Pantoea agglomerans* to protect Vitis vinifera L., cv Cabernet Sauvignon and Muscat d'Italie by reducing necrosis lengh against *Phaeomoniella chlamydospora* and *Neofusicoccum parvum*, two pathogens involved in Esca, a grapevine trunk disease. En cours de rédaction

2. Actes de congrès

-Asma BEN GHNAYA-CHAKROUN, **Awatef REZGUI,** Jessica VALLANCE, Ines KHAROUBI, Mokhtar DRIDI, Mohammed Rabeh HAJLAOUI, Patrice REY, et Najla SADFIZOUAOUI. 2014. First molecular characterization of *Phomopsis viticola* and *Diploidia seriata* isolated from Esca-BDA diseased grapevines in Northren Tunisia. *9th International Wokshop on Grapevine Trunk Diseases, 18 au 20 Novembre 2014, Adélaïde, Australie. Phytopathologia Mediterranea*, 53(3): 568-569.

-**Awatef REZGUI,** Asma BEN GHNAYA-CHAKROUN, Jessica VALLANCE, Emilie BRUEZ, Mokhtar DRIDI, Mohammed RABEH HAJLAOUI, Patrice REY, et Najla SADFIZOUAOUI. 2014. Bacteria colonizing Esca-BDA diseased grapevines in the North of Tunisia ». *9th International Wokshop on Grapevine Trunk Diseases, 18 au 20 novembre 2014, Adélaïde, Australie. Phytopathologia Mediterranea*, 53(3): 586.

-Asma BEN GHNAYA-CHAKROUN, Yathreb MASTOURI, **Awatef REZGUI,** Jessica VALLANCE, Amira YACOUB, Patrice REY, Najla SADFI-ZOUAOUI, et Lamia HAMROUNI. 2015. Maladies du bois de la vigne en Tunisie: communautés fongiques et utilisation d'huiles essentielles comme moyen de lutte. *5ème Conférence Internationale sur les Méthodes Alternatives en Protection des Cultures*, Lille, France. Pages 177 à 185.

-**Awatef REZGUI,** Asma BEN GHNAYA-CHAKROUN, Jessica VALLANCE, Emilie BRUEZ, Mohammed Rabeh HAJLAOUI, Patrice REY, et Najla SADFI-ZOUAOUI. 2015. Biocontrôle d'une maladie du bois de la vigne, l'esca, à l'aide de bactéries. *5ème Conférence Internationale sur les Méthodes Alternatives en Protection des Cultures*, Lille, France. Pages 243 à 249.

3. Communications lors de congrès internationaux (communications orales, posters)

-**Awatef REZGUI,** Badiaa ESSGHAIER, Mohammed Rabeh HAJLAOUI, Amira YACOUB, Patrice. REY et Najla SADFI–ZOUAOUI (2014). Halophilic bacteria: antifungal activities of induction of tomato plant resistance. XIII Meeting of the Working Group Biological control of fungal and bacterial plant pathogens, Uppsala, 15-18 Juin 2014, Suède (poster).

-Amira YACOUB, Emilie BRUEZ, Jonathan GERBORE, **Awatef REZGUI**, Jessica VALLANCE, Asma BEN GHNAYA CHAKROUN, Najla SADFI –ZOUAOUI, Remy GUYONEAUD et Patrice REY (2014). Investigating the indigenous plant beneficial microorganisms that naturally colonize the grapevine. XIII Meeting of the Working Group Biological control of fungal and bacterial plant pathogens, Uppsala, 15-18 Juin 2014, Suède (communication orale).

-**Awatef REZGUI,** Asma BEN GHNAYA CHAKROUN, Jessica VALLANCE, Emilie BRUEZ, Mokthar DRIDI, Mohammed Rabeh HAJLAOUI, Patrice REY et Najla SADFI–ZOUAOUI (2014). Bacteria colonizing Esca-BDA diseased grapevines in the North of Tunisia. 9th International Wokshop on Grapevine Trunk Diseases, Adelaide, 18-20 Novembre 2014, Australie (poster).

-Asma BEN GHNAYA CHAKROUN, **Awatef REZGUI**, Jessica VALLANCE, Ines KHAROUBI, Mokthar DRIDI, Mohammed RABEH HAJLAOUI, Patrice REY et N. SADFI – ZOUAOUI (2014). First molecular characterization of *Phomopsis viticola* and *Diploidia seriata* isolated from Esca-BDA diseased grapevines in Northren Tunisia. 9th International Wokshop on Grapevine Trunk Diseases, Adelaide, 18-20 Novembre 2014, Australie (poster).

-Awatef REZGUI, Asma BEN GHNAYA CHAKROUN, Jessica VALLANCE, Emilie BRUEZ, Mohammed Rabeh HAJLAOUI, Patrice REY et Najla SADFI –ZOUAOUI (2015). Biocontrôle d'une maladie du bois de la vigne, l'Esca, à l'aide des bactéries ». 5th International Conference on Alternative Methods of Crop Protection. Lille, 11-13 Mars 2015, France (communication orale).

-Asma BEN GHNAYA CHAKROUN, Yathreb MASTOURI, **Awatef REZGUI**, Jessica VALLANCE, Amira YACOUB, Patrice REY, Najla SADFI –ZOUAOUI et Lamia HAMROUNI (2015). Maladies du bois de la vigne en Tunisie : Communautés fongiques et utilisation d'huiles essentielles comme moyen de lutte. 5th International Conférence on Alternative Methods of Crop Protection. Lille, 11-13 Mars 2015, France (poster).

-Awatef REZGUI, Asma BEN GHNAYA-CHARKROUN, Jessica VALLANCE, Najla SADFI-ZOUAOUI et Patrice REY (2015). Molecular characterization of *Lasidioploidia pseudotheobromae, Neofusicoccum parvum* and *Schizophyllum commune* three pathogens of Esca diseases of grapevine in the Northern region of the Tunisia. First Workshop - COST Action FA 1303. Cognac, 23-24 June 2015, France (poster).

4. Communications lors de congrès nationaux

-Awatef REZGUI, Asma BEN GHNAYA-CHAKROUN, Amira YACOUB, Jonathan GERBORE, Jessica VALLANCE, Najla SADFI-ZOUAOUI et Patrice REY. Colonization de la rizosphère de la vigne par l'agent de biocontrôle Pythium oligandrum, influence sur la microflore indigène. Poster présenté à la 6 ème Journée des Doctorants du Département INRA Santé des Plantes et Environnement, 3 au 5 juin 2014, Bordeaux, France.

5. Chapitre d'ouvrage

-Patrice REY, Emilie BRUEZ, Jonathan GERBORE, Amira YACOUB, **Awatef REZGUI**, Nada OUHAIBI, Jessica VALLANCE, Asma BEN GHNAYA et Najla SADFI-ZOUAOUI. Biotechnologies et protection des végétaux : intérêt de la microflore colonisatrice des plantes. Soumise pour parution dans les annales du congrès sur les « 100 ans de l'INRAT ».