



HAL
open science

Impacts écophysiologicals de l'Esca : résilience des ceps et effet des modes de taille

Loris Ouadi

► **To cite this version:**

Loris Ouadi. Impacts écophysiologicals de l'Esca : résilience des ceps et effet des modes de taille. Ecologie, Environnement. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0434 . tel-02862055

HAL Id: tel-02862055

<https://theses.hal.science/tel-02862055>

Submitted on 9 Jun 2020

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

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE – SCIENCES ET ENVIRONNEMENT
Écologie évolutive, fonctionnelle et des communautés

Par

Loris OUADI

Le 17 décembre 2019

Impacts écophysiologicals de l'Esca : résilience des ceps et effet des modes de taille

Sous la direction de : Pr. Patrice REY
Co-directeur : Pr. Jean-Christophe DOMECH

Membres du jury :

M. BERTSCH, Christophe	Professeur, Université de Haute-Alsace	Rapporteur
M. COMPANT, Stéphane	Chercheur, Austrian Institute of Technology	Rapporteur
Mme GENY, Laurence	Professeure, Université de Bordeaux	Présidente
M. GRAMAJE, David	Chercheur, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino	Examinateur
M. THIS, Patrice	Directeur de recherche, INRA	Examinateur
Mme. WEINGARTNER, Sandrine	Responsable recherche, Jas Hennessy & Co	Invitée
M. DOMECH, Jean-Christophe	Professeur, Bordeaux Sciences Agro	Co-directeur
M. REY, Patrice	Professeur, Bordeaux Sciences Agro	Directeur

Remerciements

L'élaboration de cette thèse n'est pas qu'un travail personnel mais le fruit de l'intérêt, de la générosité, et de l'aide précieuse d'un grand nombre de personnes tout au long de ces trois ans. Je tiens donc à remercier en quelques lignes tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à ce travail, en espérant n'oublier personne.

Mes remerciements les plus chaleureux vont au Pr. Patrice Rey et au Pr. Jean-Christophe Domec, mes directeurs de thèse, pour leur disponibilité, nos discussions enrichissantes, leurs qualités de professionnels et d'experts dont ils m'ont fait bénéficier tout au long de cette étude. J'adresse mes remerciements aux membres du jury pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteurs, le Pr. Christophe Bertsch de l'Université de Haute-Alsace et le Dr. Stéphane Compant de l'Austrian Institute of Technology (Autriche), et en tant qu'examineurs, le Pr. Laurence Geny de l'Université de Bordeaux, le Dr. David Gramaje de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (Espagne) et le Pr. Patrice This de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA). Je tiens également à remercier Mme Sandrine Weingartner de la société Jas Hennessy & Co pour sa participation à l'évaluation de mon travail de thèse.

Mes remerciements vont aussi au Pr. Florence Fontaine, à Pascal Lecomte, au Dr. Lucia Guérin-Dubrana, au Dr. Emilie Bruez, au Dr. Jessica Vallance, au Dr. Céline Cholet et au Dr. Chloé Delmas et au Pr. Grégory Gambetta qui m'ont accompagné et offert toutes leurs compétences et savoirs sur les aspects les plus techniques de leur profession, et pour leurs réponses précises à l'ensemble de mes questions. Je les remercie de leur participation à mon comité de suivi de thèse ainsi que pour l'évaluation régulière de l'avancée de mes travaux de thèse. Je tiens à remercier les financeurs du projet de chaire industrielle GTDfree, la maison Jas Hennessy & Co et l'ANR

Ce travail n'aurait pas pu se faire sans les différentes collaborations établies au cours de ces trois années. Je remercie M. Aurélien Berthoud et Mme Delphine Preterre de la société Fruition Science ainsi que M. Pierre Darriet directeur d'exploitation au château Luchey-Halde (Bordeaux Sciences Agro), et son équipe pour leur aide précieuse dans la mise en place de mes expérimentations de thèse. Je remercie M. Gilles Taris, M. Lionel Druelle, pour leur appui technique sur la mise en place des mes expérimentations terrain. Je remercie également le Dr. Marie-Cécile Dufour, le Dr. Amira Yacoub, Mme Sylvie Bastien, Mme Cindy Coppin et M. Ray Godfrey, pour m'avoir donné l'opportunité d'apprendre différentes techniques et méthodologies qui ont contribué à la rigueur de mes résultats.

Je remercie également M. Robert Tessier et M. Yves Granger du CGAAER et M. Alexandre Pery directeur de l'école doctorale ABIÉS, pour leur suivi et leur précieux conseil dans l'avancée de mon parcours de thèse.

Merci à ma famille et à mes amis pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de la thèse.

Table des matières

Remerciements	2
Liste des figures	6
Liste des abréviations, des sigles et des acronymes	7
Chapitre 1 – Etat de l’Art	9
Avant-propos 1.....	9
I. La vigne	11
I.1. Présentation et description du genre <i>Vitis</i> L.....	11
I.2. Cycle de développement de la vigne.....	13
I.3. Importance économique de la filière.....	15
I.3.1. La filière mondiale	15
I.3.2. La filière française	17
I.4. La vigne, une culture soumise à de fortes contraintes sanitaires	18
II. Les maladies du bois de la vigne.....	21
II.1. Conséquences de la recrudescence des MDB sur la filière viticole	21
II.2. <i>Botryosphaeria dieback</i>	22
II.2.1. Pathogènes impliqués.....	22
II.2.2. Symptômes associés	23
II.3. <i>Eutypa dieback</i>	23
II.3.1. Pathogènes impliqués.....	23
II.3.2. Symptômes associés	24
II.4. L’Esca	24
II.4.1. Pathogènes impliqués.....	24
II.4.2. Symptômes associés.....	25
III. Caractérisation du pathosystème associé à l’Esca	29
III.1. Historique de la maladie	30
III.2. Les champignons associés à l’Esca	34
III.2.1. Les champignons trachéomycotiques	34
III.2.2. Les Basidiomycètes.....	35
III.2.3. Autres champignons associés à l’Esca	35
III.3. Reproduction des symptômes d’Esca au niveau du bois et des feuille.....	36
III.4. Métabolites secondaires impliqués dans la pathogénicité.....	37
III.4.1. Mode d’action des toxines.....	38
III.4.2. Enzymes de dégradation du bois.....	38
III.4.3. Action des bactéries.....	39
III.5. Facteurs biotiques et abiotiques influençant l’Esca	40
III.5.1. Facteurs biotiques	40
III.6.1.1. L’âge.....	40
III.6.1.2. La sensibilité variétale	41
III.5.2. Facteurs abiotiques.....	42
III.6.2.1. Les conditions pédoclimatiques	42
III.6.2.2. Les pratiques culturales.....	43
III.6. L’Esca et l’œnologie	43
IV. Impact de l’Esca sur l’anatomie et la physiologie de la vigne.....	44
IV.1. Particularités anatomiques de la vigne	44
IV.1.1. Le bois de la vigne	44
IV.1.2. Le modèle CODIT : compartimentation de la pourriture dans le tronc.....	45
IV.2. Complication pathologique : dysfonctionnements vasculaires causés par les phénomènes de cavitation, d’embolie et de tyloses	48

IV.3.	Perturbation de l'activité de différents organes de la vigne	49
IV.3.1.	Impacts sur la maturation des baies	51
IV.3.2.	Impact physiologique sur les feuilles.....	51
IV.3.3.	Perturbation physiologique des rameaux	54
IV.3.4.	Perturbations physiologiques liées à la décoloration des tissus du tronc	55
IV.4.	Mouvements de l'eau dans le continuum sol-plante-atmosphère (CSPA) et régulation stomatique	56
IV.4.1.	Régulation des mouvements stomatiques.....	57
IV.4.2.	Caractérisation de la réponse stomatique face à différents stress	57
V.	Pratiques agronomiques et stratégies de lutte contre l'Esca.....	58
V.1.	Généralités.....	59
V.2.	Méthodes préventives	60
V.2.1.	La taille Guyot-Poussard, une taille historique	60
V.2.2.	Taille précoce vs. Taille tardive.....	62
V.2.3.	La taille en deux temps.....	62
V.2.4.	La taille mécanique et taille rase de précision (TRP)	63
V.2.5.	La taille minimale ou non-taille.....	64
V.3.	Méthodes de protection des plaies de taille	65
V.3.1.	Protection chimique	65
V.3.2.	Agents de biocontrôle	65
V.4.	Stratégies de gestion des vignobles infectés	67
V.4.1.	Recepage ou TTR (Timely Trunk Renewal).....	67
V.4.2.	Curetage.....	68
V.4.3.	Regreffage	69
V.4.4.	Complantation.....	69
V.4.5.	Taille des rameaux symptomatiques	70
V.5.	Méthodes innovantes de traitement post-infection.....	70
V.5.1.	Injections de peroxyde d'hydrogène dans le tronc des ceps	70
V.5.2.	Insertion de fongicides dans le tronc des ceps	71
V.5.3.	Insertion d'inocula de <i>Trichoderma</i> spp. dans le tronc des ceps	71
V.5.4.	Insertion de clous en cuivre dans le tronc des ceps	72
V.5.5.	Endothérapie végétale.....	72
V.6.	Méthodes de contrôles de l'Esca en pépinières	73
VI.	Objectifs de thèse	75
	<i>Chapitre 2 - Suivi de la réponse écophysiological de ceps infectés par l'Esca et étude des mécanismes impliqués.....</i>	79
	<i>Avant-propos 2.....</i>	79
I.	Encart : les capteurs de flux de sève.....	82
I.1.	La méthode "Granier" de dissipation thermique	83
I.2.	La méthode par bilan de chaleur	85
II.	Article 1.....	87
III.	Article 2 (en voie de soumission)	107
	<i>Assessment of sap flow disruption related with the physiological and genetic reponses following Esca infection of Vitis vinifera L.</i>	107
I.	INTRODUCTION.....	108
II.	MATERIALS AND METHODS.....	110
II.1.	Plant material.....	110
II.2.	Leaf-level physiological parameters	112
II.2.1.	Stomatal conductance (g _s)	112
II.3.	Dualex measurements	112
II.3.1.	Leaf area index (LAI).....	113
II.4.	Sap flow monitoring.....	113

II.5.	Necroses image-analyses	115
II.6.	Gene expression	116
II.6.1.	RNA extraction	116
II.6.2.	Real-time RT-qPCR analysis.....	117
II.7.	Statistical analysis	118
III.	RESULTS.....	118
III.1.	Climatic context.....	118
III.1.1.	Esca-foliar symptoms and necrotic wood ratio.....	120
III.1.2.	Average grapevine water use and transpiration	122
III.1.3.	Leaf stomatal conductance, photosynthesis and phenolic activity	125
III.1.4.	RT-qPCR profiles of primary metabolism physiological functions	131
IV.	DISCUSSION	135
IV.1.	Climatic context and Esca symptomatology	135
IV.2.	Transpiration response to Esca infection.....	136
IV.3.	Response of complementary physiological indicators to Esca infection.....	138
IV.4.	RT-qPCR leads to detect physiological dysfunction within Esca-symptomatic grapevine leaves	139
V.	SUPPORTING INFORMATION	141
VI.	ACKNOWLEDGMENTS	144
VII.	REFERENCES.....	145
Chapitre 3 - Comparaison de deux modes de taille sur la physiologie des ceps.		
Liens avec l'expression de l'Esca.....		151
I.	INTRODUCTION.....	151
II.	Matériels et méthodes	156
II.1.	Matériel végétal.....	156
II.2.	Indicateurs physiologiques.....	157
II.2.1.	Conductance stomatique (g_s)	158
II.2.2.	Mesures d'indices optiques foliaires (Dualox®)	158
II.3.	Indicateurs agronomiques	159
II.4.	Analyses statistiques.....	159
III.	Résultats	160
III.1.	Contexte expérimental	160
III.2.	Indicateurs physiologiques.....	161
IV.	Discussion	168
Chapitre 4 - Discussion générale et perspectives		171
I.	Contexte général.....	171
II.	Objectif principal de la thèse et discussion des résultats.....	173
III.	Perspectives	180
Collaborations et valorisation des travaux.....		183
I.	1. Collaborations.....	183
II.	2. Valorisation scientifique des résultats de la thèse.....	184
II.1.	Publications internationales à comité de lecture	184
II.2.	Communications orales lors de congrès	184
II.3.	Communication par posters lors de congrès	184
Références bibliographiques		185

Liste des figures

Figure 1: Les stades phénologiques de la vigne (IFV, 2009).....	14
Figure 2: Superficie en vigne à l'échelle internationale et classification des variétés les plus cultivées. A) Superficie de vigne et destination de la production de raisin (source OIV, 2017). B) Classification des variétés (source OIV, 2017).	17
Figure 3: Les opérations techniques au vignoble (Reynier, 2011).....	19
Figure 4: Indicateur de fréquence de traitement (IFT) moyen, tous traitements confondus par bassin viticole en 2016 (source, Agreste – Enquête sur les pratiques phytosanitaires en viticulture 2016).....	20
Figure 5: Symptômes sur vigne du syndrome de l'Esca.	28
Figure 6: Illustration de symptômes de maladies cryptogamiques datant de la fin du 19ème et du début du 20ème siècle (source Larignon, 2016). A) Syndromes associés à l'Esca.....	32
Figure 7: Modèle CODIT montrant l'emplacement des quatre murs dans le bois. (Adapté de Shigo et Marx 1977).	46
Figure 8: Illustration du dispositif expérimental de mesure de flux de sève selon la méthode "Granier" de dissipation thermique	84
Figure 9: Illustration du dispositif expérimental de mesure de flux de sève selon la méthode par bilan de chaleur.....	86
Figure 10: Corrélation entre le système de taille et l'infection par les champignons des maladies du bois (Sosnowski, 2016)	153
Figure 11: Guyot-Poussard : taille orientée qui préserve les flux de sève. (Légende : triangles noir = plaies de tailles, lignes rouges = flux de sève). (http://simonitesirch.com).	154
Figure 12: Présentation des conditions climatiques des deux années de suivi physiologique.	160
Figure 13: Comparaison de la conductance stomatique (gs) des feuilles mesurées sur des ceps taillés dans le respect des flux de sève (V+) par rapport à des ceps à taille rase (V-).....	162
Figure 14: Comparaison de l'évolution de trois indicateurs physiologiques foliaires en fonction d'une taille respectueuse des flux de sève (V+) et d'une taille rase (V-).	163
Figure 15: Comparaison de trois indicateurs de vigueur entre des ceps ayant subis une taille respectueuse des flux de sève (V+) et des ceps à taille rase (V-).	165
Figure 16: Comparaison de trois composants de rendement entre des ceps ayant subis une taille respectueuse des flux de sève (V+) et des ceps à taille rase (V-).	167
Figure 17: Corrélation entre le développement des plaies de taille et des nécroses (cônes de dessiccation) (à gauche : baguette et courson d'un an; à droite : coupe rase sur du vieux bois). (Crespy, 2006) [362].	169

Liste des abréviations, des sigles et des acronymes

ABA :	Acide abscissique.
ALDH2 :	Aldéhyde déshydrogénase 2.
AOP :	Appellation d'origine protégée.
ARNm :	Acide ribonucléique messenger.
ATP :	Adénosine triphosphate.
BNIC :	Bureau National Interprofessionnel du Cognac.
CO ₂ :	Dioxyde de carbone.
CODIT :	Compartmentalization Of Decay In Tree.
CNIV :	Comité National des Interprofessions des vins.
Réseau DEPHY :	Réseau de Démonstration, Expérimentation et Production de références sur les systèmes économes en phytosanitaires.
Fm :	Fomitiporia mediterranea.
GLSD :	Grapevine Leaf Stripe Disease.
gs :	Conductance stomatique.
GST :	Glutathion S-Transférase.
GSTF2 :	Glutathion S-transferase F2.
GSTU1 :	Glutathion S-transferase U1.
HCO ₃ :	Hydrogénocarbonate ou bicarbonate.
HSP :	Heat Shock Proteins (Protéine de choc thermique).
IFT :	Indicateur de Fréquence de Traitements phytosanitaires.
IFV :	Institut français de la vigne et du vin.
IGP :	Indication Géographique Protégée.
IPCC :	Intergovernmental Panel on Climate Change (Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'évolution du climat, organisme intergouvernemental ouvert à tous les pays membres de l'ONU. Il regroupe actuellement 195 États.
MDB :	Maladie du Bois de la Vigne.
Pch :	Phaeomoniella chlamydospora.
Pmin :	Phaeoacremonium minimum.

Pn :	Photosynthèse nette.
PPO :	Polyphénol-oxydase.
PR :	Pathogenesis Related.
PSII :	Le photosystème II est une oxydoréductase qui catalyse la réaction : $2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{ plastoquinone} + 4 \text{ hv} \text{ O}_2 + 2 \text{ plastoquinol}$. Ce complexe enzymatique est le premier à intervenir dans les réactions de la photosynthèse dépendantes de la lumière.
RT-qPCR :	Quantitative reverse transcription PCR : technique permettant de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) quantitative à partir d'un échantillon d'ARN.
SICAVAC :	Service Interprofessionnel de Conseil Agronomique, de Vinification et d'Analyses du Centre.
SmHSPS :	Small Heat-Shock Proteins (protéines de petit choc thermique).
TRP :	Taille Rase de Précision.
UE :	Union Européenne.
USPP-T1 :	Souche de Trichoderma atroviride.
VPD :	Déficit de pression de vapeur.

Chapitre 1 – Etat de l’Art

Avant-propos 1

En France, l'agriculture utilise plus de la moitié de la surface du territoire métropolitain et la filière vitivinicole y occupe une place prépondérante puisqu'il existe des vignobles dans 66 départements. La superficie du vignoble, avec environ 750 000 hectares, soit 3% de la surface agricole française totale, n'est cependant pas très importante. Néanmoins au niveau de la viticulture mondiale, la France est un acteur majeur car son vignoble représente 10% de la surface totale de vignes de cuve. Cette place de choix est particulièrement significative au niveau économique. La filière vitivinicole représente 15% de la production agricole française et la France est le 1^{er} pays exportateur de vin et eau-de-vie de vin en valeur au monde. En 2018, le chiffre d'affaires à l'export était de 12,2 milliards d'euros, loin devant l'Italie [1]. Les vins et spiritueux français sont les seconds contributeurs à la balance commerciale de notre pays, derrière l'aéronautique et devant les cosmétiques avec 11,5 milliards d'euros. Ils sont également les premiers contributeurs à la balance commerciale pour l'agroalimentaire [1].

Cette situation, a priori favorable, est pourtant mise en danger par plusieurs menaces. La viticulture est en effet, de façon similaire aux crises sanitaires (oïdium, phylloxera, mildiou) de la fin du XIX^{ème} siècle, face à de profonds bouleversements induits par l'évolution du climat, une nouvelle crise sanitaire majeure, l'épidémie des maladies du bois (MDB) de la vigne et de fortes attentes sociétales pour une viticulture respectueuse de l'environnement. Les maladies du bois sont associées à des champignons pathogènes envahissant les parties aériennes, ligneuses et pérennes de la vigne: tronc et bras, et sont responsables de dépérissements importants dans de nombreux vignobles de par le monde.

En France, les trois principales maladies du bois de la vigne sont l'Esca, l'eutypiose [2] et les dépérissements à Botryopshaeriaceae. Elles sont très dommageables pour la pérennité du patrimoine viticole car les parasites responsables de ces pathologies peuvent diminuer, à plus ou moins long terme, la longévité d'un vignoble [3–5] et affecter la qualité des raisins produits par les vignes malades [6]. La plus importante d'entre elles, l'Esca, était contrôlée jusqu'en novembre 2001 par l'arsénite de sodium dont l'utilisation a été interdite du fait de sa toxicité pour l'Homme et l'environnement [7]. Sa suppression inquiète les viticulteurs car aucune autre méthode de lutte curative efficace n'est actuellement homologuée. Ces dernières années, des produits de biocontrôle ont été homologués. L'un d'eux nommé Esquive, est élaboré à base d'un champignon mycoparasite, *Trichoderma atroviride*. Les résultats sont cependant variables d'une année à l'autre et la protection est loin d'être aussi efficace qu'avec l'arsénite de sodium. Le maintien de l'outil de production en terme quantitatif et qualitatif à l'échelle des régions viticoles françaises et européennes est donc compromis [5]. Les conséquences de cette maladie sont actuellement dommageables, les pertes sont par exemple chiffrées à environ 1 milliard d'euros uniquement en France mais elles pourraient s'accroître à moyen terme. Une dépréciation de la qualité des vins suite à un rajeunissement des parcelles, une perte de la typicité d'un vin d'une région viticole suite à la non-replantation des cépages les plus sensibles, sont envisageables [8]. Face à cette crise technique et sanitaire, il est important d'apporter aux viticulteurs des moyens de lutte efficaces, respectueux de l'environnement et économiquement acceptables pour les exploitations.

La mise au point de moyens de lutte nécessite une meilleure compréhension du mode de développement et de propagation de l'Esca, de ses répercussions sur le comportement physiologique de la vigne, et de son risque d'évolution et d'extension accrue avec le changement climatique, en particulier avec la réduction des précipitations estivales [9]. Cette thèse se situe dans cette logique et elle se focalisera sur l'influence de l'Esca sur le fonctionnement physiologique des ceps. Une pratique culturale, la taille des ceps, censée promouvoir ou limiter le développement de cette maladie sera aussi étudiée sous ce même angle d'approche scientifique.

I. La vigne

I.1. Présentation et description du genre *Vitis* L.

La vigne est une plante ligneuse, pérenne, dont le nom vernaculaire englobe aussi bien des espèces sauvages que cultivées. Elles se présentent sous la forme d'angiospermes dicotylédones qui appartiennent à la classe des Magnoliopsida et à l'ordre des Rhanales [10,11]. Elles font partie de la famille des Vitacées, composée de 14 genres de différentes importances [12]. Le genre *Vitis*, cultivé pour la production de raisin depuis plus de 7000 ans [13] compte aujourd'hui plus d'une centaine d'espèces répertoriées [14]. Le genre *Vitis* est composé de deux sous-genres aux caractéristiques anatomiques, morphologiques et cytologiques distinctes: *Muscadinia* ($2n = 40$ chromosomes) et *Euvitis* ($2n = 38$ chromosomes) [15]. Le sous-genre *Euvitis* regroupe les principales espèces d'intérêt agronomique, distinguées en fonction de leur origine géographique. Il comprend les vignes américaines, les vignes asiatiques et les vignes européennes.

Les vignes asiatiques regroupent une quinzaine d'espèces dont *Vitis amurensis*, connue pour être résistante au froid (-40°C) et à 2 maladies : l'anthracnose et l'oïdium [16]. Le groupe européen est représenté par une seule espèce, *Vitis vinifera* [17] au sein de laquelle on distingue la vigne sauvage *V. sylvestris* et la vigne cultivée *V. sativa*. *V. vinifera* est presque exclusivement utilisé de part le monde pour la qualité de ces baies afin de produire divers produits, dont le vin, du jus de raisin ou du raisin de table.

Le groupe des vignes américaines est composé d'une vingtaine d'espèces dont *Vitis labrusca*, *V. rupestris*, *V. riparia* et *V. cinerea*. Ces espèces ont une faible qualité uvifère, mais portent des résistances naturelles à un large panel d'agents pathogènes et sont couramment utilisées comme porte-greffe sur 85% du vignoble mondial. Durant le 19^{ème} siècle, une vingtaine d'espèces américaines ont ainsi été introduites en Europe. Certains plants étaient malencontreusement contaminés par des pathogènes qui ont généré des maladies inconnues à cette époque par les viticulteurs européens. Les épidémies associées à ces nouveaux pathogènes ont marqué l'Histoire de la viticulture jusqu'à la période actuelle, certaines d'entre elles sont en effet toujours une préoccupation majeure pour la profession

viticole. Les trois principales introductions d'agents pathogènes en Europe, en provenance d'Amérique du Nord, ont été : (1) *Erysiphe necator*, l'agent fongique responsable de l'oïdium introduit en Angleterre en 1845. Il causa très rapidement des attaques fulgurantes et des pertes de récoltes atteignant plus de 50% en 1852 en France. (2) Dix huit années plus tard, en 1863, un insecte hémiptère de la famille des Phylloxeridae, *Dactylosphaera vitifoliae*, fut signalé pour la première fois en France. Il est responsable du Phylloxera qui eut une importance économique et sociale dramatique sur la viticulture française et européenne. La quasi-totalité du vignoble fut dévastée et dut être intégralement reconstituée. Actuellement, le Phylloxera a colonisé presque tous les vignobles du monde. (3) Quinze années plus tard, en 1878, *Plasmopara viticola*, un oomycète agent du mildiou fut introduit en France, et causa, selon les années, des épidémies fulgurantes, caractérisées par la présence de foyers primaires dans les parcelles, pouvant s'étendre très rapidement.

L'apparition de ces maladies a généré de nouvelles méthodes de lutte qui ont modifié depuis lors la protection de la vigne. La lutte génétique, via l'utilisation de porte-greffes issus des différentes espèces américaines naturellement résistantes à cet insecte, est le moyen de lutte le plus efficace, mais aussi celui qui est généralisé contre ce parasite [18]. La lutte phytosanitaire, ou chimique, a pris son essor pour lutter contre les deux agents pathogènes responsables de l'oïdium ou du mildiou. Elle génère, selon les années, un nombre de traitements élevés.

Concernant l'espèce, *V. vinifera*, sa domestication progressive par l'homme a permis de sélectionner, au fil des générations, des plants produisant avec des rendements élevés, et ayant des baies contenant des taux de sucre élevés, ce qui facilite la fermentation [19]. La vigne cultivée pour le vin et le raisin se décline en différents cépages ou cultivars, résultant de croisements naturels ou de sélections génétiques. Les cépages se différencient par leurs qualités organoleptiques et leur mode de consommation (raisin de table, sec et de cuve) [18]. En France, plus de 200 cépages différents sont autorisés, mais uniquement une dizaine est plantée dans les deux tiers des vignobles. Chaque terroir possède des cépages adaptés aux différentes conditions environnementales : le climat semi-continentale dans les régions Alsace, Champagne Ardenne et Bourgogne ; le climat océanique dans la région Bordelaise et la vallée de la Loire ; le climat méditerranéen dans le Rhône, le Midi, la Provence et la Corse.

I.2. Cycle de développement de la vigne

Le développement de la vigne s'effectue annuellement en deux cycles distincts (Fig 1) utilisant les ressources de la photosynthèse ou des réserves nutritives produites les années précédentes: un cycle végétatif et un cycle reproducteur [20]. Le cycle de la vigne s'effectue selon une succession de stades phénologiques définis comme stades repères par Baggiolini en 1952 [21] et Eichhorn et Lorenz en 1977 [22]. La durée de chaque stade varie en fonction du climat, du cépage, du terroir et du mode de conduite.

Pour les vignes de l'hémisphère nord, le cycle végétatif débute au printemps, en mars/avril, et se termine à l'automne, vers la mi-novembre/décembre. Un cycle hivernal, au cours duquel la plante entre en dormance, lui succède jusqu'en mars. Le début du cycle végétatif est associé à une reprise d'activité du système racinaire. La sève circule de nouveau dans la plante, et des écoulements de sève brute appelés « pleurs », dus à la poussée racinaire déclenchée par la hausse de température du sol, peuvent être observés à la surface des plaies de taille non cicatrisées. Vers la mi-avril, sous l'effet de la mise en tension du système circulatoire, les bourgeons de l'année précédente gonflent, les écailles les protégeant s'écartent et laissent apparaître la « bourre », un tissu de protection cotonneux et brunâtre. Cette phase de débourrement, se poursuit par l'allongement des rameaux et l'étalement des feuilles. La croissance des organes végétatifs dépend des conditions climatiques, en particulier des températures et de la disponibilité en eau [23] et s'arrête en juillet/août, ce qui permet aux grappes de se développer. La vigne procède ensuite à une phase d'aoûtement qui se traduit par une accumulation de réserves sous forme d'amidon et la lignification progressive des différents organes du cep. La perte des feuilles, en novembre et décembre, marque la fin du cycle végétatif. La circulation de la sève s'arrête progressivement et la vigne entre en dormance jusqu'au printemps suivant. Au cours de l'hiver, les opérations de taille permettent d'optimiser la future production de fruits par l'élimination de 80% des sarments apparus lors du précédent cycle végétatif. Les blessures infligées au cep, constituent alors une voie d'entrée privilégiée pour de nombreux microorganismes, pathogènes ou non-pathogènes.



Les stades phénologiques de la vigne

L'Institut Français de la Vigne et du Vin conduit des missions de portée générale pour l'ensemble de la filière viti-vinicole, dans les domaines de la sélection végétale, de la viticulture, de la vinification et de la mise en marché des produits. L'IFV est implanté dans l'ensemble des bassins viticoles grâce à ses stations régionales.



Stade A ou 01 ou 00
Bourgeon d'hiver
L'oeil de l'année précédente est presque entièrement recouvert par deux écailles protectrices brunâtres.



Stade B ou 03 ou 05
Bourgeon dans le coton
L'oeil gonfle, ses écailles s'écartent et la bourre est très visible. Ce stade suit les pleurs.



Stade C ou 05 ou 09
Pointe verte
L'oeil continue à gonfler et à s'allonger. Il présente une pointe verte constituée par la jeune pousse.



Stade D ou 06 ou 11
Sortie des feuilles
Des feuilles rudimentaires rassemblées en rosette apparaissent. Leur base est encore protégée par la bourre progressivement rejetée hors des écailles.



Stade E ou 09 ou 13
2 à 3 feuilles étalées
Les premières feuilles sont totalement dégagées et présentent les caractères variétaux. Le rameau est nettement visible.



Stade F ou 12 ou 53
Grappes visibles
Les grappes rudimentaires apparaissent au sommet de la pousse. Quatre à six feuilles étalées sont visibles.



Stade G ou 15 ou 55
Boutons floraux encore agglomérés
Les grappes s'espacent et s'allongent sur la pousse. Les boutons floraux sont encore agglomérés.



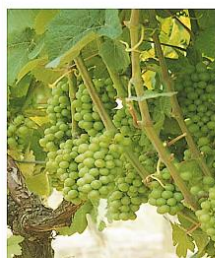
Stade H ou 17 ou 57 Boutons floraux séparés
Les boutons floraux sont nettement isolés. La forme typique de l'inflorescence apparaît.



Stade I ou 23 ou 65
Floraison
Les capuchons se détachent à la base et tombent. Les étamines et le pistil sont visibles. Après ce stade, vient la nouaison des grains.



Stade K ou 31 ou 75
Petit pois
Les grains ont la taille d'un petit pois. Les grappes pendent.



Stade L ou 33 ou 77
Fermeture de la grappe
Les baies atteignent une taille suffisante pour se toucher.



Stade M ou 36 ou 81
Véraison
Les baies s'éclaircissent pour le raisin blanc ou se colorent pour le raisin noir.



Stade N ou 38 ou 89
Maturité
Les baies sont prêtes pour la récolte car elles ont atteint leur maturité technologique.



Stade O ou 43 ou 93
Début de la chute des feuilles.



Stade 47 ou 97
Fin de la chute des feuilles à l'automne.

Depuis 1994, la notation des stades phénologiques de la vigne s'effectue suivant une échelle numérique s'étalant de 1 à 47, établie par **Eichhorn & Lorenz**. Cette échelle complète celle de **Baggiolini**, notée de A à O, surtout au niveau de la floraison. Enfin, il existe une échelle universelle pour toutes les monocotylédones et les dicotylédones, appelée **BBCH** (Biologische Bundesanstalt bundessortenamt and CHemical industry). Chaque stade est défini par une lettre et deux chiffres dans l'ordre : Baggiolini, Eichhorn & Lorenz et **BBCH**.

Institut Français de la Vigne et du Vin - Domaine de l'Espiguette - 30240 Le Grau du Roi - www.vignevin.com

Figure 1: Les stades phénologiques de la vigne (IFV, 2009).

Le cycle reproducteur s'effectue pendant la saison végétative. Du mois d'avril à mai, les inflorescences apparaissent, puis se développent en boutons floraux qui se séparent ensuite par l'allongement des pédicelles floraux et du rachis. De mai à juin, la floraison aboutit à la libération du pollen. Chaque grappe comporte 100 à 200 fleurs hermaphrodites dont la fécondation peut-être autogame ou allogame [11,23]. Après la fécondation, tous les organes floraux disparaissent, à l'exception des ovaires (futurs baies) et des ovules (futurs pépins), qui se développent au cours de la nouaison. Pendant l'aoûtement, les baies continuent de se développer, et changent de couleur passant du vert au jaune pour les cépages blancs, ou au violet pour les cépages rouges. Cette coloration appelée la véraison se caractérise par une accumulation de sucres et de substances de réserves dans la pulpe et les pépins : aleurone, amidon, huile. Au cours de la maturation, les baies atteignent progressivement leur taille définitive et accumulent des sucres, des éléments minéraux, des acides aminés et des composés phénoliques, tels que des tanins, des arômes ou des anthocyanes. Lorsque les baies atteignent leur taille maximale et arrivent à pleine maturité, les vignes peuvent être vendangées. La période des vendanges peut varier d'août à novembre en fonction du cépage, du climat, de la maturité des baies et du type de vin considéré.

I.3. Importance économique de la filière

I.3.1. La filière mondiale

Avec près de 7,5 millions d'hectares cultivés et 73 millions de tonnes de fruits récoltés en 2017, la vigne cultivée est l'une des cultures fruitières ligneuses pérennes les plus importantes et les plus rentables au monde [24]. Le continent européen, avec plus de 3,5 millions d'hectares cultivés et 28,9 millions de tonnes récoltées, est le premier producteur mondial de raisin, suivi par l'Asie (2,04 millions d'hectares), l'Amérique du Sud (0,53 million d'hectares), et l'Amérique du Nord (0,43 million d'hectares) [25].

Depuis les années 2000, la Chine représente le moteur principal de la croissance de la superficie viticole dans le monde et est arrivée à la deuxième place des pays producteurs, avec une surface de 0,87 millions d'hectares en 2017, soit 12% de la surface totale mondiale, après l'Espagne : 0,97 millions d'hectares, soit 13% de la surface totale, et devant la France:

0,79 millions d'hectares, soit 10% de la surface totale [24]. Face à l'augmentation de la production de raisin de table, la production de raisin pour le vin tend à diminuer depuis le début des années 2000. La production mondiale de vin, hors jus et moûts, a été estimée en 2018 à 279 millions d'hectolitres (Mhl), soit une augmentation de 13% par rapport à 2017. Cette augmentation est toutefois à relativiser car elle faisait suite à une baisse exceptionnelle de 14,6% en 2017 par rapport à 2016, due aux conditions climatiques, particulièrement défavorables au sein des pays membres de l'Union Européenne (UE) [24].

Les principaux pays producteurs de vin en 2018, sont l'Italie (48,5 Mhl), la France (46,4 Mhl) et l'Espagne (40,9 Mhl). La consommation mondiale des vins, estimée en 2017 à 244 Mhl, s'est stabilisée depuis la crise économique de 2008. Les Etat-Unis sont les plus grands consommateurs (32,6 Mhl) suivis par la France (27 Mhl) et l'Italie (22,6 Mhl) [24]. La France est le premier exportateur mondial en valeur avec 9 milliards d'euros exportés en 2017, soit 30% de la valeur mondiale [26], (Fig.2).

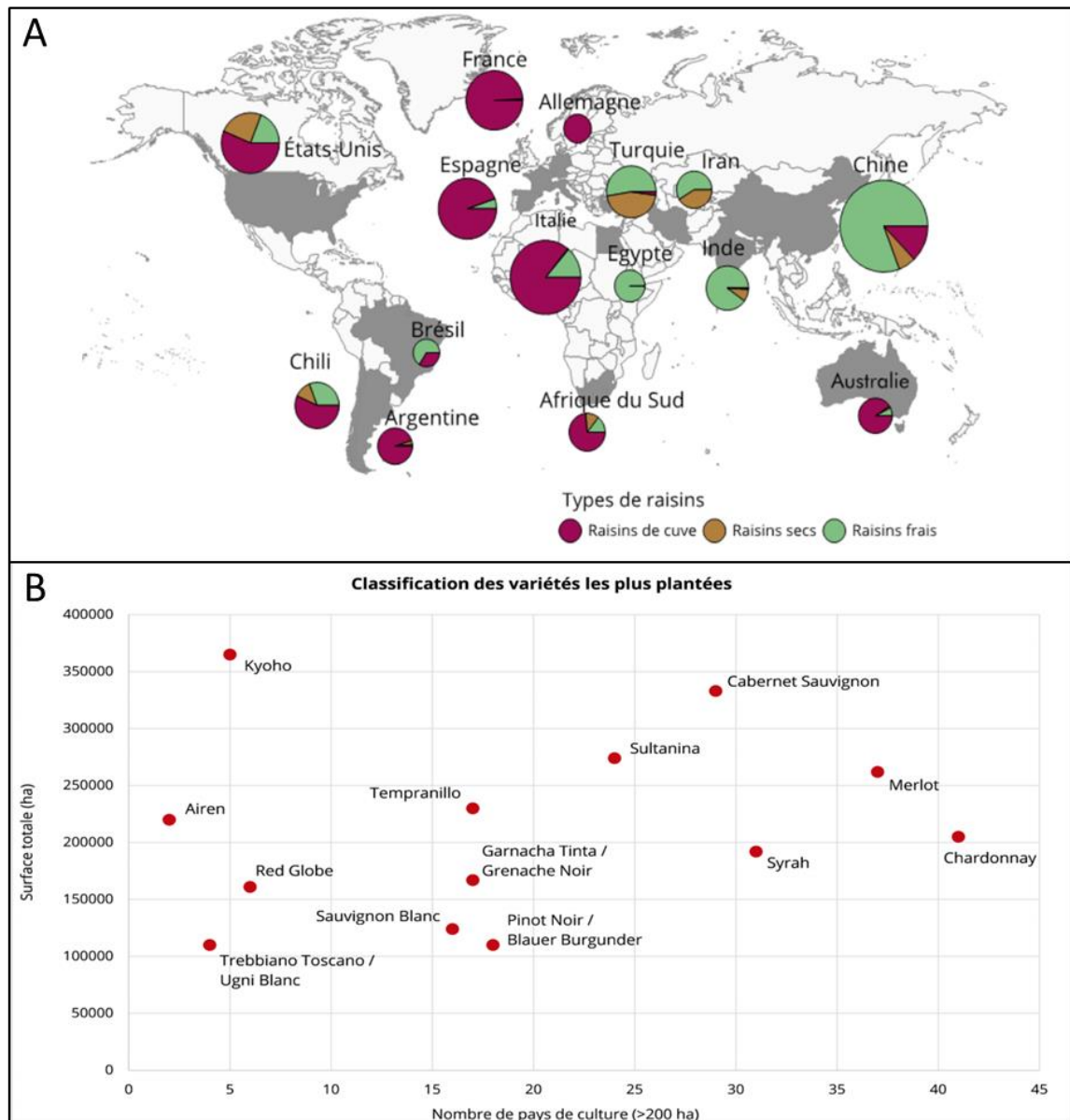


Figure 2: Superficie en vigne à l'échelle internationale et classification des variétés les plus cultivées. A) Superficie de vigne et destination de la production de raisin (source OIV, 2017). B) Classification des variétés (source OIV, 2017).

I.3.2. La filière française

La viticulture occupe une place importante dans l'agriculture française. Avec un chiffre d'affaire global, estimé à plus de 13 milliards d'euros en 2018 [27], la viticulture représente 15% de la production agricole en valeur, pour seulement 3% des surfaces agricoles françaises soit environ 750 000 hectares [28]. La production de vin représente en France le deuxième secteur d'exportation (8,9 milliards d'euros générés en 2018) [28] mais

également le premier secteur excédentaire de l'agroalimentaire. La filière viti-vinicole est également un secteur clé de l'emploi puisqu'elle crée environ 600 000 emplois directs et indirects.

De plus, l'attractivité du patrimoine viticole français permet de générer des revenus supplémentaires via l'œnotourisme. Chaque année, environ 10 millions d'œnotouristes dont 30% d'étrangers, ont l'opportunité de visiter plus de 10 000 caves, 31 musées liés au vin, répartis dans 36 destinations labellisées « Vignobles et découvertes » et 66 départements viticoles [29].

I.4. La vigne, une culture soumise à de fortes contraintes sanitaires

Au vignoble, les opérations techniques (Fig. 2) sont réparties tout au long de l'année [18]. Parmi elles, les opérations de taille ont un rôle très important. La taille hivernale, permet de préparer la future récolte tandis que les tailles en vert, effectuées au cours de la saison végétative (i.e. épamprage, rognage, éclaircissage et effeuillage), permettent de contrôler la vigueur des ceps. Cette période est également marquée par l'application régulière de nombreux traitements phytosanitaires, afin protéger ou limiter les attaques par les différents agents pathogènes, principalement ceux du mildiou, de l'oïdium, du botrytis. Le calendrier des opérations techniques devant être effectuées au vignoble met en évidence deux problématiques majeures. D'une part, les nombreuses opérations de tailles de la vigne au cours d'une année de production offrent aux agents pathogènes de nombreuses portes d'entrée pour contaminer les plants. D'autre part, l'utilisation intensive de produits phytosanitaires en viticulture, constitue un risque pour la santé humaine, la préservation de l'environnement ainsi qu'une baisse de leur efficacité. En effet, de nombreux produits sont associés à une persistance de résidus polluants dans les sols (e.g. le cuivre), une contamination de l'agroécosystème, et à l'apparition de souches résistantes de phytopathogènes [30].

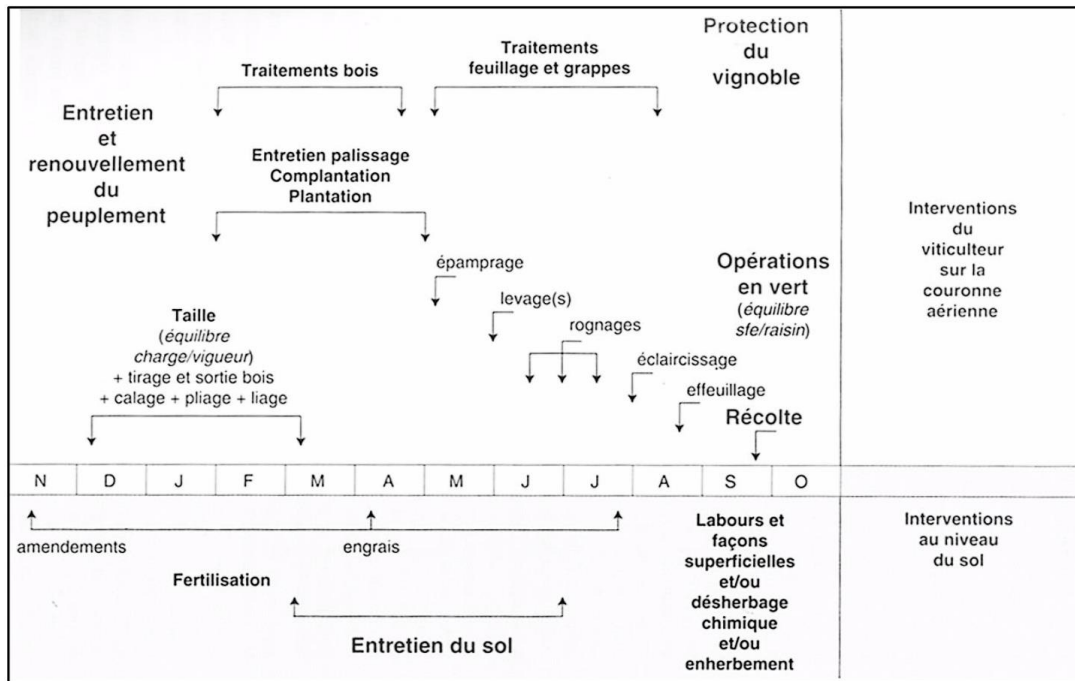


Figure 3: Les opérations techniques au vignoble (Reynier, 2011).

La culture de la vigne génère des coûts de production substantiels. Une part importante de ces coûts est liée à la gestion des ravageurs et des maladies qui nécessitent la mise en place de pratiques culturales adaptées, l'achat de produits de lutte chimique et/ou biologique, et leur application [31]. En France, les contraintes phytosanitaires liées à la culture de la vigne représentent un enjeu majeur au niveau financier, environnemental et sociétal. La viticulture est l'un des secteurs consommant le plus d'intrants chimiques [32]. L'indice de fréquence de traitement (IFT) est un bon indicateur de l'utilisation des produits phytosanitaires [33]. Il correspond à la moyenne par hectare de l'utilisation des produits phytosanitaires homologués, pondérée par le rapport entre la dose appliquée et la dose recommandée. En France, l'indice moyen de fréquence de traitement en viticulture est de 15,5 [34]. En 2011, la viticulture représentait ainsi près de 3,3% de la surface agricole utile (SAU) pour 14,4% d'utilisation de pesticides dont 80% de fongicides [35]. Les produits phytosanitaires utilisés en viticulture servent avant tout à protéger la récolte, la viticulture occupant une place prépondérante de l'économie française. A ce titre, *V. vinifera* est l'une des plantes d'intérêt agronomique cumulant la plus grande variété d'agents pathogènes : virus, phytoplasmes, bactéries, champignons et bioagresseurs [36].

Depuis le Grenelle de l'environnement en 2007 et le lancement des plans Ecophyto, dont Ecophyto II+ en 2018, la réduction des intrants phytopharmaceutiques est au cœur des problématiques de la filière viticole. A ce titre, le réseau d'exploitations viticoles DEPHY, a

été créé en 2010 pour développer, mutualiser et diffuser les mises en œuvre réussies de systèmes viticoles à faible niveau d'intrants. Ce réseau regroupe aujourd'hui près de 560 viticulteurs engagés volontairement dans une démarche de réduction d'usage des produits phytosanitaires. Les attentes sociétales de réduction des intrants en viticulture incitent les exploitants à modifier leurs pratiques, mais également les organismes de recherche à développer des alternatives techniques aux molécules retirées du marché ou qui le seront prochainement [37], (Fig. 4).

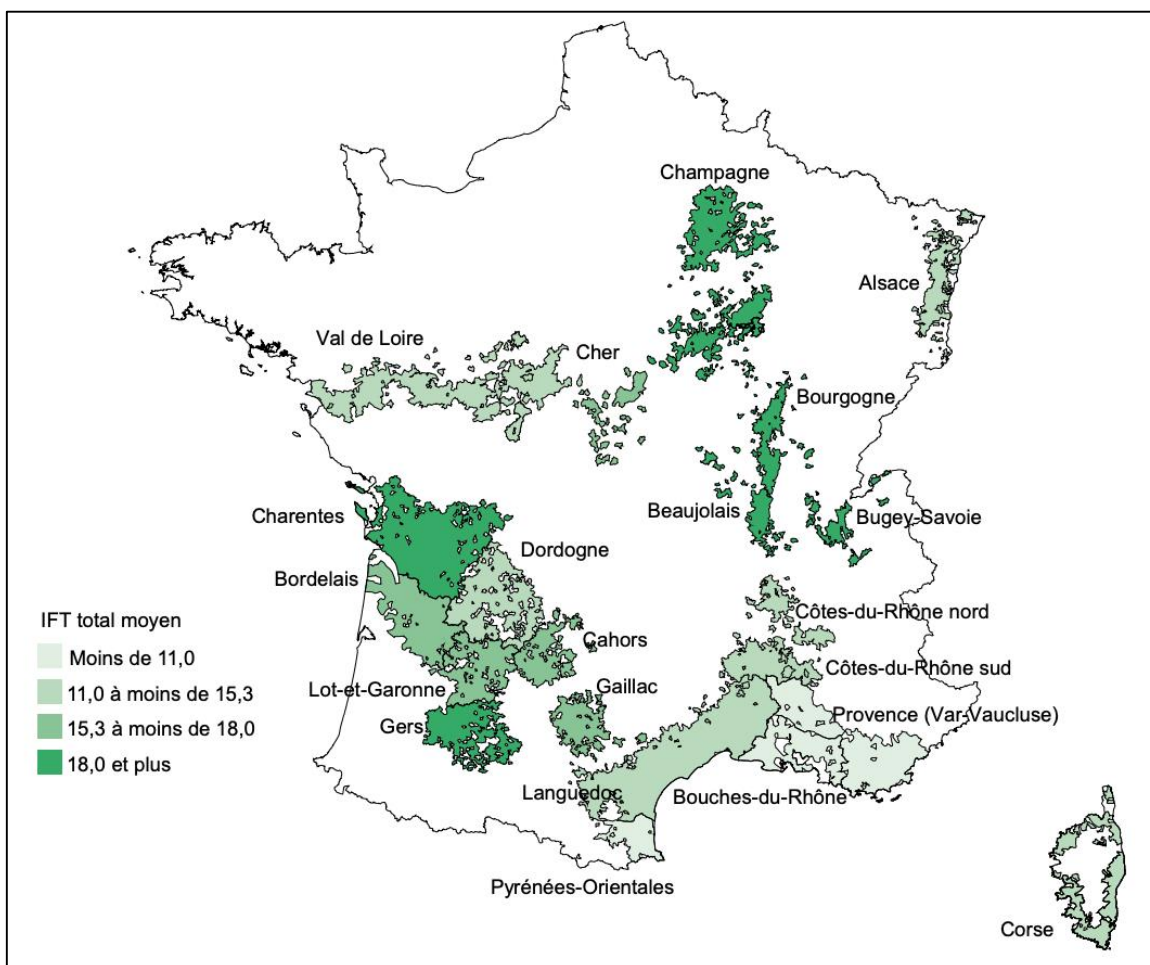


Figure 4: Indicateur de fréquence de traitement (IFT) moyen, tous traitements confondus par bassin viticole en 2016 (source, Agreste – Enquête sur les pratiques phytosanitaires en viticulture 2016).

Pour résumer la situation au vignoble, on peut insister sur le fait que la viticulture est actuellement, de façon similaire aux crises sanitaires de la fin du XIX^{ème} siècle (oïdium, phylloxera, mildiou), à la croisée des chemins faisant face à de profonds bouleversements induits cette fois par l'évolution du climat, une nouvelle crise majeure, l'épidémie des maladies du bois (MDB) de la vigne, *i.e.* Esca, eutypiose et dépérissements à *Botryosphaeriaceae*, et de fortes attentes sociétales pour une viticulture respectueuse de l'environnement.

II. Les maladies du bois de la vigne

Les maladies du bois de la vigne (MDB), principales causes de dépérissement des ceps, sont définies par un ensemble de symptômes, pouvant être observés sur les feuilles, dans le bois et les tissus vasculaires des ceps. L'apparition de ces symptômes est attribuée à un groupe de champignons pathogènes, capables de coloniser le bois des ceps au travers des plaies de taille [38]. Les champignons associés aux MDB représentent le plus grande communauté d'agents pathogènes pouvant infecter la vigne [39–48]. A ce jour, près de 133 espèces fongiques, appartenant à 34 genres différents, ont été associées aux MDB à travers le monde [49]. Les spores des champignons associés aux MDB peuvent infecter la vigne à travers tout type de plaie ouverte, y compris celles causées par les opérations de rognage et d'épamprage [50]. Toutefois, les plaies de taille constituent un point d'entrée privilégié pour les agents pathogènes, en fournissant chaque saison et tout au long de la vie d'un vignoble, de nombreux sites d'infection [49].

II.1. Conséquences de la recrudescence des MDB sur la filière viticole

Bien que les MDB aient été identifiées dès la fin du 19^{ème} siècle, ce n'est que depuis une vingtaine d'années que leur impact sanitaire sur la filière est devenu une problématique majeure. L'augmentation de l'incidence des MDB à travers le monde est la conséquence de plusieurs facteurs. Tout d'abord, l'épisode de plantation intensive qui a marqué le monde de la viticulture dans les années 1990, a participé à la diffusion de matériel de plantation de médiocre qualité et/ou potentiellement infecté par les MDB [42,51]. L'évolution des méthodes de production vers une conduite plus intensive des vignes, notamment par la mécanisation des vignobles, a également contribué à l'augmentation significative du nombre de plaies de taille. Enfin, dans certains pays, au début des années 2000, l'interdiction de l'arsénite de soude, et le retrait progressif des fongicides à base de benzimidazole ou de bromure de méthyl, pour des raisons de santé publique et environnementales [52], a eu pour conséquence l'élimination des produits chimiques les plus efficaces contre les MDB.

En France, les pertes liées à ces pathologies sont colossales : 12% du vignoble est rendu improductif, entraînant chaque année, un manque à produire de 4,6 hl.ha⁻¹ [1], soit près de 7,5% de la production nationale. Les coûts supplémentaires générés par l'arrachage des ceps morts, le rajeunissement des parcelles et la mise en place de nouvelles méthodes de lutte, ont été estimées à plus d'un milliard d'euros par l'Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV). Depuis une dizaine d'années l'incidence croissante des symptômes associés aux MDB est responsable d'une diminution de 23% de la surface des vignes mères de greffons [1]. Au-delà des pertes économiques engendrées par la diminution des rendements et le remplacement des plants improductifs, la prolifération des MDB dans les zones d'appellation d'origine contrôlée pourrait entraîner le déclassement de certains vignobles, aggravant ainsi l'impact économique des maladies du bois sur la filière. En France, un taux de pieds manquants ou morts supérieur à 20%, entraîne la perte du bénéfice de l'Appellation d'Origine Protégée (AOP).

Aujourd'hui, les dépérissements causés par les MDB menacent la pérennité du patrimoine viticole [4,53,54]. Ces maladies s'attaquent aux tissus vasculaires, contaminant ainsi les organes pérennes de la vigne, ce qui peut provoquer à plus ou moins long terme, la mort du cep. Par ailleurs, plusieurs MDB peuvent se développer au sein d'un même plant, rendant difficile l'identification précise des symptômes dans les parcelles. En particulier, les symptômes foliaires attribués à l'Esca peuvent facilement être confondus avec des stress abiotiques comme des brûlures thermiques, des carences nutritives ou un déficit hydrique [49], conduisant à un diagnostic erroné et menant au déploiement de moyens de luttés inappropriés.

II.2. Botryosphaeria dieback

II.2.1. Pathogènes impliqués

Le *Botryosphaeria dieback* est associé à des champignons ascomycètes de la famille des *Botryosphaeriaceae*. A ce jour, 26 espèces sont associées à ce type de dépérissement [47,55–59]. En France, les *Botryosphaeriaceae* les plus communs sont *Neofusicoccum parvum*, *Diplodia seriata* et *Diplodia mutila* [60]. Des tests de pathogénicité ont démontré qu'au sein de la famille des *Botryosphaeriaceae*, les espèces fongiques appartenant aux

genres *Lasiodiplodia* et *Neofusicoccum* comptent parmi les plus virulentes au sein des MDB [61–63].

Les *Botryosphaeriaceae* développent des pycnides au niveau du cep ou des bois de taille. La libération des pycniospores s'effectue lors d'épisodes humides [64–66], mais le processus d'infection, faisant suite à la dissémination des spores par le vent, n'est pas encore totalement élucidé. L'hypothèse la plus répandue est que les spores pénétreraient par les plaies de taille [62], pour se développer, produire du mycélium [67] et coloniser progressivement le cep infecté.

II.2.2. Symptômes associés

Les rameaux touchés par le *Botryosphaeria dieback* sont souvent caractérisés par un retard de croissance, un dessèchement des bourgeons et la présence de nécroses au niveau du xylème [47]. Dans le bois des ceps, le *Botryosphaeria dieback* entraîne l'apparition de nécroses sectorielles en forme de V, qu'il est difficile de différencier de celles causées par l'eutypiose. Sur le terrain, il est possible de distinguer ces deux types de dépérissement par l'absence de symptômes foliaires parmi les ceps infectés par *Botryosphaeriaceae* [61,68–70]. En effet, les symptômes foliaires associés au *Botryosphaeria dieback* n'apparaissent au vignoble qu'un ou deux ans après l'infection [68,69], et sont principalement observés sur des vignes matures, de plus de 8 ans, bien que certains cas aient été décrits sur des vignes âgées de 3 à 5 ans [61].

II.3. Eutypa dieback

II.3.1. Pathogènes impliqués

L'*Eutypa dieback*, ou eutypiose, a pour agent pathogène *Eutypa lata* [71–73], un champignon ascomycète de la famille des Diatrypacées. Parmi les agents pathogènes associés aux MDB, *E. lata* est la seule espèce connue pour être responsable de l'apparition de symptômes foliaires [46], et pour laquelle le postulat de Koch a pu être complètement vérifié. *E. lata*, n'a pu être isolé qu'au niveau des bras et du tronc de la vigne [74]. Les

symptômes observés sur les parties aériennes des ceps infectés, seraient dus à la synthèse de toxines fongiques, dont l'eutypine, transportées par les vaisseaux du xylème [75].

II.3.2. Symptômes associés

Au niveau de la partie herbacée, les symptômes d'eutypiose se traduisent par un raccourcissement des entre-nœuds et une modification de la structure des feuilles. L'aspect crispé et chlorotique des feuilles correspond à une dégradation des chloroplastes entraînant un déclin photosynthétique et à terme la mort du cep [76,77]. Les symptômes foliaires peuvent se déclarer 3 à 8 ans après l'infection [78,79] et varient d'une année à l'autre [80]. Un dessèchement des inflorescences est également observable provoquant la diminution en nombre et en taille des grappes. Au cours de leur maturation, les baies prennent un aspect millerandé, et dans les cas les plus sévères, la nouaison peut être marquée par d'importants phénomènes de coulure [81]. Au niveau du bois, des nécroses sectorielles dures de couleur brune se développent à partir de la zone de blessure et se prolongent dans le reste du bois. Ces nécroses prennent une forme de V, observable au niveau de la section transversale des bras et du tronc [76].

II.4. L'Esca

II.4.1. Pathogènes impliqués

En 1926 Pierre Viala [82] décrit l'Esca comme une maladie de dépérissement associant le phénomène d'apoplexie à la présence de « pourriture blanche », ou amadou. Le syndrome de l'Esca est provoqué par un complexe de différents champignons pathogènes dont les principaux sont *Phaeoacremonium minimum* [43,83], *Phaemoniella chlamydospora* [84], *Fomitiporia mediterranea* [85,86] ainsi que certains *Botryosphaeriaceae*.

P. minimum et *P. chlamydospora* sont des champignons ascomycètes largement répandus dans les régions viticoles du monde [87–90], qui ont été isolés dans les nécroses brunes et dures des ceps infectés par l'Esca. *P. minimum* appartient à l'ordre des Calosphaeriales, à la famille des Chaetosphaeriaceae [91] et est disséminé par voie aérienne

au cours de la phase végétative [92,93]. *P. chlamydospora* appartient à l'ordre des Chaetothyriales, à la famille des Herpotrichiaceae et est disséminé par voie aérienne lors des périodes douces et pluvieuses de la saison hivernale [93]. La libération des spores de ces deux champignons pathogènes, à proximité des plaies de taille, constitue la première cause de contamination des ceps par l'Esca. Les pycnides produites par *P. chlamydospora* et les périthèces développés par *P. minimum* ont été isolés au niveau de profondes blessures du bois [87,94]. Le mycélium de *P. minimum* se développe au sein des vaisseaux conducteurs de sève [95], et colonise l'intérieur des parois secondaires des cellules du bois. Les conidies produites par ces deux champignons ont également été retrouvées au niveau de la sève brute des ceps contaminés [96–98]. *P. chlamydospora* et *P. minimum* ont été isolés sur le matériel de propagation produit en pépinière [93,99–101]. *P. chlamydospora* a notamment été retrouvé dans les bassins d'hydratation, sur les outils de greffage [102,103] ainsi que sur des plantes commerciales [104,105].

F. mediterranea est un champignon basidiomycète de la famille des Hyménochaetacés, responsable de la « pourriture blanche » ou amadou, correspondant au stade ultime de dégradation du bois. Principalement isolé dans l'amadou, ce champignon est considéré comme un colonisateur secondaire, qui tire profit des dégradations cellulaires provoquées par *P. minimum* et *P. chlamydospora* pour entraîner la dégradation complète des tissus [106]. Les basidiospores de cet agent pathogène, disséminées par voie aérienne lorsque les températures dépassent 10°C et que le taux d'humidité est supérieur à 80% [98], se développent au niveau des vaisseaux hydro-actifs du xylème [97].

II.4.2. Symptômes associés

L'Esca infecte généralement des ceps de vigne âgés de 15 à 25 ans, mais des études ont montré que les jeunes plants pouvaient également être atteints [107]. La dégradation des tissus ligneux et la production de certains composés toxiques par les champignons pathogènes de l'Esca, causent des perturbations dans le métabolisme de la plante et l'apparition de symptômes foliaires. En effet, les agents pathogènes impliqués dans l'Esca, déstructurent de façon complémentaire le bois pour aboutir à l'expression de la maladie sous deux formes, celle dite lente caractérisée par l'apparition de symptômes foliaires, également

appelée « Grapevine Leaf Stripe Disease » (GLSD), et celle dite apoplectique où le cep dépérit de façon foudroyante [38,108] (Fig 3).

Les symptômes foliaires sont caractéristiques du GLSD même s'ils peuvent être observés sur les ceps apoplectiques [82,98,109,110]. A l'heure actuelle, le GLSD est associé à un syndrome de trachéomyose, une maladie vasculaire principalement causée par *P. chlamydospora* et *P. minimum*, capables de coloniser les trachéides du xylème et ainsi causer l'obstruction des vaisseaux fonctionnels du bois [4,38,98,105,111,112]. On peut aussi noter que toute une série de symptômes existent entre les stades GLSD et l'apoplexie [113].

Les premiers symptômes foliaires apparaissent selon les régions entre la fin du mois de juin et la mi-juillet, et se manifestent régulièrement durant toute la période végétative. Ils apparaissent au vignoble sous la forme de digitations jaunes sur les cépages blancs et de digitations rouges bordées de jaunes sur les cépages rouges. Ces décolorations internervaires évoluent progressivement vers un brunissement et un dessèchement des feuilles [114]. Les symptômes foliaires de la forme lente n'apparaissent pas systématiquement sur les ceps contaminés d'une saison sur l'autre et peuvent donc être latents [112]. Dans le bois des ceps exprimant des symptômes foliaires, différents types de nécroses peuvent être observées [60]:

1. une nécrose centrale de couleur claire, entourée d'une zone brune et dure, causée par *P. minimum* et *P. chlamydospora* ;
2. une nécrose sectorielle claire et tendre à partir de laquelle sont isolés *E. lata* et *F. mediterranea* [60]. Ce dernier étant responsable de la formation d'amadou.

Pour l'Esca, des symptômes précoces peuvent apparaître à la fin du printemps, sous la forme d'un ralentissement ou d'une absence de croissance des rameaux [38]. L'écorce du tronc et des rameaux peut également se fissurer [97]. Enfin, au niveau des feuilles et des baies, les symptômes apparaissent généralement entre la floraison et la véraison [87] et peuvent se déclencher sur tout ou partie du pied contaminé. Sur les baies, les symptômes observés diffèrent selon les pays. En France, les grappes se développent mais les fruits flétrissent, se dessèchent ou subissent un retard de maturation [98]. En Italie [115,116], et en Californie [110], les symptômes sur fruits correspondent à l'apparition de taches foncées ou au gonflement des baies pouvant conduire à leur éclatement.

La forme apoplectique est caractérisée par un dessèchement rapide des organes aériens (rameaux, feuilles et grappes) d'une partie ou de la totalité du cep. Cette forme foudroyante se manifeste généralement lors d'épisodes de sécheresse [117], et entraîne la mort des ceps en quelques heures ou quelques jours seulement. Les causes de l'apoplexie sont encore méconnues, mais il semblerait que de fortes pluies, suivies d'épisodes venteux et de températures élevées, favorisent son apparition au vignoble [38,97]. Néanmoins, il a été montré que l'apoplexie pouvait survenir en l'absence de précipitations [117].

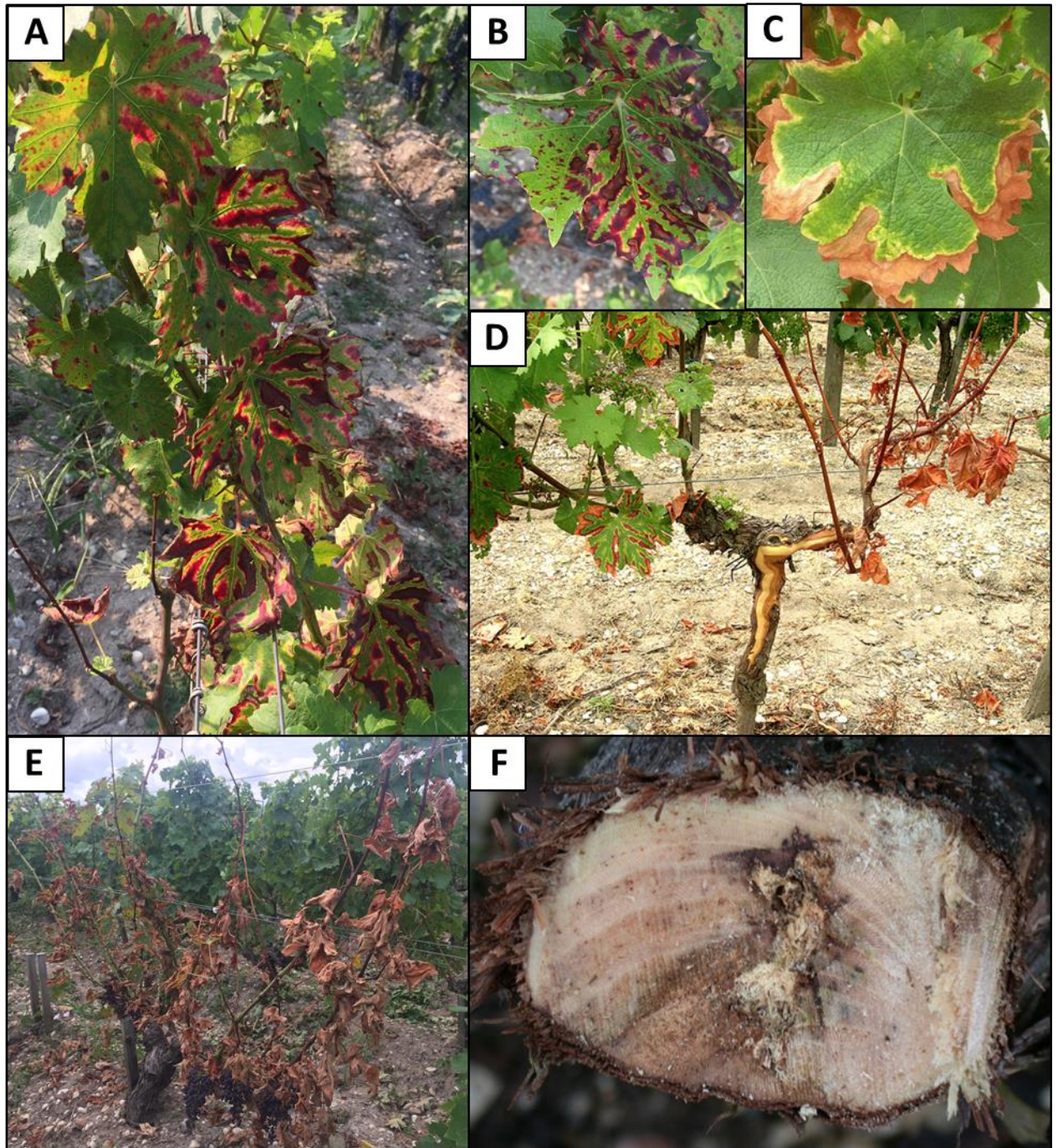


Figure 5: Symptômes sur vigne du syndrome de l'Esca.

(A, B) décolorations internervaires caractéristiques de la forme lente de l'Esca (GLSD), (C) symptômes de sécheresse pouvant être confondu avec les décolorations foliaires associées à l'Esca, (D) bande brune présente sous l'écorce des ceps infectés (E) défoliation caractéristique de la forme apoplectique, (F) coupe transversale d'un tronc infecté présentant une nécrose sectorielle accompagnée d'amadou (teinte claire et friable).

(Ephytia INRA – photographies P.Lecomte, photographies personnelles).

III. Caractérisation du pathosystème associé à l’Esca

Les dépérissements dus à l’Esca impliquent des pathosystèmes complexes, pour lesquels il est nécessaire d’avoir une approche globale de la plante dans son environnement. Cette complexité est liée au développement systémique des champignons dans les tissus du bois, à la non-permanence des symptômes foliaires d’une année à l’autre, ainsi qu’à la difficulté d’identifier et de hiérarchiser les facteurs biotiques et abiotiques impliqués dans ces maladies. Pour l’Esca, le postulat de Koch, destiné à identifier le lien entre maladies et agents responsables, n’est que partiellement vérifié. Il l’est en effet pour la formation des nécroses dans le bois, mais il l’est rarement au niveau des feuilles. Par exemple, le lien entre la présence d’amadou et l’apparition des symptômes foliaires a été rapporté mais doit être consolidé au niveau des résultats. Jusqu’à présent, les inoculations artificielles de Fm ont permis de reproduire la formation d’une structure ressemblant ou étant de l’amadou mais il n’y avait pas de symptômes foliaires [118].

Différentes hypothèses ont été émises pour expliquer la pathogénicité des champignons associés à l’Esca. En effet, le pouvoir pathogène pourrait être corrélé avec la capacité des champignons à produire des enzymes de dégradation du bois, leur permettant de pénétrer et de progresser dans la plante. A l’heure actuelle les champignons pathogènes de l’Esca ont pu être isolés dans le bois des ceps contaminés mais jamais dans les feuilles symptomatiques [60]. Certains scientifiques attribuent donc l’apparition des symptômes foliaires à la sécrétion de toxines, émises par les champignons colonisateurs du bois, qui migreraient via les vaisseaux du xylème jusqu’aux organes aériens, entraînant l’apparition de symptômes sur les feuilles et les baies [38]. D’autres auteurs, émettent l’hypothèse que des complexes bactériens participeraient à la déstructuration du bois de la plante, et auraient une action conjointe avec les champignons pathogènes de l’Esca, permettant de faciliter la colonisation des tissus [119].

Les recherches sur le microbiote, par des techniques de séquençage haut-débit, ont été initiées au début de cette décennie [119] et se sont très rapidement développées. Le microbiote a été étudié en tenant compte de plusieurs facteurs censé l’influencer : les saisons au cours d’une année [106], l’âge des ceps [120], les différents cépages. L’influence des pratiques culturales comme la taille [121], les traitements à l’eau chaude [122] ou à l’arsénite

de sodium sur sa composition sont maintenant mieux documentées. Pour la première fois, en complément de l'étude des champignons historiquement associés aux MDB, l'étude des bactéries colonisant le bois de la vigne a été réalisée [123]. Une hypothèse sur le lien entre microbiome et expression des symptômes foliaires a été faite par Del Frari *et al.* (2019) [124], et la première étude sur le microbiome du sol d'un vignoble atteint par l'Esca a été présentée [125].

III.1. Historique de la maladie

Les premières références aux symptômes d'Esca ont été mentionnées dans plusieurs ouvrages grecs et latins [38]. Dès l'Antiquité, Pline l'Ancien évoque dans *Naturalis Historia* (Histoire Naturelle), la relation entre les symptômes de la partie herbacée et les zones de bois desséchées [126]. Jusqu'au XIX^e siècle, ce dépérissement, associé à un dessèchement des rameaux et des feuilles, est attribué à un dysfonctionnement physiologique appelé « folletage ». En 1898, L. Ravaz associe cette maladie à une origine fongique [127] et en 1922, P. Viala officialise le terme « Esca » en l'associant à la forme apoplectique et à la présence d'amadou dans le bois des ceps [128] (Fig 6). En 1926, P. Viala identifie, deux basidiomycètes qu'il suppose être responsables de la maladie, *Stereum hirsutum* et *Phellinus igniarius*, et préconise l'emploi de composés arsenicaux comme moyen de lutte [82]. A partir des années 1990, les recherches sur l'Esca s'intensifient suite à l'augmentation du nombre de ceps atteints dans les vignobles. Les traitements à base d'arsénite, traditionnellement utilisés avec une grande efficacité pour contrôler l'Esca ont par la suite été interdits dans tous les pays viticoles européens à partir de 2003. D'autres facteurs biotiques et abiotiques, ont depuis contribué à la recrudescence de ce dépérissement et à la crise sanitaire actuelle qui menace la pérennité du vignoble mondial.

Suite à la recrudescence et à l'augmentation de ces maladies en France vers la fin des années 1990, un Observatoire National des Maladies du Bois a été mis en place, d'abord sur une période de 6 années (2003-2008), afin de faire un état des lieux et d'évaluer l'évolution des symptômes foliaires, puis jusqu'à la période actuelle dans certaines régions (Alsace, Charentes, Jura). Lors de la première période, l'Observatoire a disposé de 623 parcelles (300 ceps observés par parcelle) réparties dans les différents vignobles français et 27 cépages ont

été suivis. Les résultats ont montré que, selon les années, 50 à 83 % des parcelles appartenant à leur réseau avaient manifesté des symptômes d'Esca. On peut noter que durant la même période, le nombre de ceps atteints par l'eutypiose tendait à régresser [5,129]. L'analyse de ces données a montré que tous les cépages, de toutes les régions viticoles françaises, sont concernés, même si des différences notables sont observées [5,129]. Par exemple, le cépage Ugni Blanc est très sensible à l'eutypiose et à l'Esca (Charentes) alors que le Savagnin et le Trousseau (Jura) le sont principalement à l'Esca. De plus, selon les régions, un même cépage peut-être atteint dans des proportions identiques par l'Esca, e.g. le Sauvignon dans les vignobles de Bordeaux, de Bourgogne et du Centre, ou de façon plus importante dans une région par rapport à une autre, e.g. le Cabernet-Sauvignon est plus atteint dans le bordelais par rapport à la région Provence-Alpes Côte d'Azur. Des observations préliminaires indiqueraient aussi qu'il existe des clones dont la sensibilité à l'Esca est supérieure à la sensibilité globale de la variété. Il est important de mentionner que si l'Esca était habituellement présent chez les vignes âgées, les observateurs rapportent qu'il est aussi de plus en plus observé au niveau de jeunes vignes [130].

Pour avoir une vue complète de la situation, il faut cependant considérer l'expression aléatoire des symptômes foliaires. Ainsi un cep pourra exprimer des symptômes une année, et être asymptomatique l'année suivante. De ce fait si l'on considère une période de plusieurs années, le nombre de « ceps symptomatiques au moins une fois » est beaucoup plus informatif. Par exemple, Grosman et Doublet (2012) [129], ont rapporté que durant un suivi effectué dans une parcelle en Bourgogne, l'incidence (nombre de ceps atteints/parcelle) annuelle était basse, 3-4%, mais qu'au total 21% des ceps avaient exprimés l'Esca durant une période de 10 années. Des observations semblables effectuées en Italie par Surico et al. (2000) [117], montrent que dans une parcelle où l'incidence annuelle de l'Esca était de 11% à 19%, l'incidence cumulative était de 50% sur une période de 6 ans. Les mêmes auteurs ont montré que pour 3 autres parcelles les valeurs pouvaient atteindre 50% (Sienne, période de 11 années), 30% (Ravenne, période de 6 années) et 51% (Florence, période de 5 années).

De l'Antiquité jusqu'à notre époque moderne, l'Esca est décrit comme un dépérissement complexe dont il est difficile de mesurer l'ampleur. Néanmoins, au cours des siècles, il apparaît que les conseils donnés par les agronomes des différentes époques (e.g. Théophraste, Pline l'Ancien, Columelle, Palladius et Pierre de Crescens), pour lutter contre la pourriture du bois, ont peu évolués. En effet, les méthodes décrites pour assainir les ceps

infectés, comme le curetage, le recépage, la protection des plaies ou le greffage, sont toujours utilisées aujourd'hui [126].



Figure 6: Illustration de symptômes de maladies cryptogamiques datant de la fin du 19ème et du début du 20ème siècle (source Larignon, 2016). A) Syndromes associés à l'Esca

L'antracnose ponctuée ou grandinée (Fabre et Duval, 1853). B) Esca, dessin d'H. Boisgontier (Viala, 1926. C) Esca, dessin d'A. Millot (Viala, 1926). D) Esca, dessin d'H. Boisgontier (Viala, 1926).

L'Esca est un regroupement de plusieurs syndromes causés principalement par des champignons, les 3 plus communément cités étant : *P. chlamydospora* (Pch), *P. minimum* (Pmin) et *F. mediterranea* (Fm). Ils peuvent coloniser le bois des ceps au travers des diverses blessures infligées depuis la pépinière jusqu'au vignoble et sont responsables de cinq syndromes distincts, en fonction de l'âge du cep et de l'origine de l'infection [49,131,132].

[1] Le premier syndrome, causé par Pch sur des boutures de vigne, ne présente pas de symptômes externes. Des nécroses internes pouvant produire un exsudat de couleur noire se développent autour de la moelle centrale [38].

[2] Le deuxième syndrome ou **maladie de Pétri**, également causé par Pch, se manifeste sur de jeunes plants de vigne et peut conduire à leur mort prématurée. Sur les plants infectés, des nécroses noires, accompagnées d'exsudats visqueux, identiques au premier syndrome, peuvent être observés à l'intérieur du tronc [133–135]. La maladie de Pétri provoque le rachitisme d'une partie ou de l'ensemble du pied, un arrêt complet de la croissance, une chlorose des feuilles, une réduction des rendements et une diminution progressive de la vigueur [136].

[3] Le troisième syndrome ou **GLSD** correspond à l'expression des symptômes foliaires typiques de l'Esca. Les coupes transversales réalisées sur ces ceps ont révélé, en plus des nécroses décrites dans les deux premiers syndromes, des zones avec du bois sombre et la présence de nécroses brunes. Ces zones peuvent être centrales ou sectorielles et se développent dans le tronc et les rameaux. Enfin, sous l'écorce, des stries brunes ou jaunâtres peuvent être observées dans le cambium.

[4] Le quatrième syndrome ou **pourriture blanche** est lié à l'activité du champignon Fm [86]. Sous l'action de cet agent pathogène, le bois se décompose en une masse spongieuse et friable de couleur blanche (amadou). En coupe transversale, la zone atteinte est souvent délimitée par une ligne sombre qui sépare l'amadou du tissu sain. Cette pourriture blanche est principalement localisée à proximité des plaies de taille et peut, dans les cas les plus sévères, se propager jusqu'à la surface externe du bois.

[5] Le cinquième syndrome ou « **Esca proper** » se manifeste lorsque les effets des trois principaux champignons associés à l'Esca (Pch, Pmin, Fm) se superposent. La

colonisation des vaisseaux du xylème par Pch et Pmin (trachéomyose) [4,98,105,111,112] et la production d'amadou par Fm, concourent de façon synergique au dépérissement du cep. De plus, d'autres agents pathogènes tels que *Botryosphaeria* spp., *E. lata*, ou *Phomopsis viticola*, peuvent être à l'origine de nécroses supplémentaires.

III.2. Les champignons associés à l'Esca

La diversité des champignons pathogènes colonisant les vignes exprimant des symptômes d'Esca varie selon les pays. En Europe, les espèces fongiques majoritaires comprennent Pch, Pmin, Fm, *Stereum hirsutum*, *Phomopsis viticola*, *E. lata* et plusieurs espèces de la famille des Botryosphaeriaceae [49,60,137,138].

III.2.1. Les champignons trachéomycotiques

Deux espèces de champignons sont associées au phénomène de trachéomyose et aux différents syndromes de l'Esca: Pch et Pmin. Ces deux espèces fongiques colonisent les tissus du xylème [139], participent à l'occlusion des vaisseaux fonctionnels [96,140–142] et pourraient jouer un rôle dans l'expression des symptômes foliaires via la production de phytotoxines [143], ou de diverses enzymes [144–146].

Pch pénètre dans le cep au travers des différentes blessures infligées au cep, et colonise progressivement les vaisseaux fonctionnels. Des dépôts noirs peuvent apparaître au niveau des trachéides suite à son passage [135]. L'infection par Pch peut également se produire en pépinière [135,147], entraînant la colonisation du porte-greffe et/ou du greffon [87,100]. Les colonies de Pch sont observables sous la forme de pycnides noires qui se développent sur du mycélium sporulant [135].

Pmin infecte les plants par la production de périthèces qui ont été retrouvés sur des tissus vasculaires morts, à la surface de plaies de taille, ainsi que dans des fissures à l'intérieur du tronc et des bras de ceps symptomatiques [94,148]. Hormis les conidies produites par Pmin, les ascospores peuvent constituer une source supplémentaire d'inoculum [94].

III.2.2. Les Basidiomycètes

Stereum hirsutum, est une espèce fongique pathogène, fréquemment isolée dans les vignes symptomatiques de vignobles espagnols [149], qui se retrouve dans les couches externes du bois. Son développement serait favorisé en conditions de stress hydrique et pourrait être à l’origine de la formation de pourriture, comparable à de l’amadou, dans le bois de jeunes vignes [60,149]. La faible fréquence d’isolement et la distribution limitée de ce basidiomycète dans le reste de l’Europe, n’ont pas permis de déterminer son rôle dans l’Esca.

Fm se propage par l’intermédiaire de spores aéroportées [150] et se retrouve principalement dans les parties supérieures du tronc [85]. Le mycélium produit par Fm est caractérisé par la présence d’hyphes jaunâtres ou brunâtres. Fm est majoritaire dans l’amadou qui a une texture spongieuse et friable. Les basidiospores constituent la source d’inoculum de cette espèce fongique [151].

III.2.3. Autres champignons associés à l’Esca

Phomopsis viticola, généralement associé à l’excoriose [48,85], a été isolé sur des ceps infectés par l’Esca à partir de prélèvements de bois de taille [147], de rameaux symptomatiques, et d’amadou [85,149,152,153].

Eutypa lata est l’agent responsable de l’eutypiose. Il pénètre dans les ceps par l’intermédiaire des plaies de taille [76] et colonise les tissus internes du bois par la formation de nécroses [154]. En France, en Grèce et en Allemagne, ce champignon pathogène a été isolé sur des vignes atteintes d’Esca [60,85,111,138], au niveau des nécroses brunes sectorielles et à proximité de l’amadou [60]. *E. lata* pourrait avoir un rôle pionnier dans la colonisation du bois par les agents pathogènes de l’Esca. Les ascospores d’*E. lata*, qui constituent la source d’inoculum, sont libérés à partir des périthèces, dispersés dans les vignobles par la pluie et le vent [155–157].

Les **Botryosphaeriaceae** sont une famille ubiquiste de la vigne. La variabilité de la virulence des différentes espèces pathogènes qui la compose, serait influencée par différents facteurs tels que le type de cépage, le stade phénologique ou les conditions environnementales [63]. Parmi les Botryosphaeriaceae colonisant la vigne [158], deux espèces affectent particulièrement les ceps en voie de dépérissement, touchés par le Botryosphaeria dieback ou l’Esca : *Diplodia seriata* et *Neofusicoccum parvum* [159]. L’expression des symptômes sur la partie herbacée (tigrure des feuilles, défoliation des rameaux) commence à partir de la floraison et se termine autour de la véraison [160], elle fait également suite à l’augmentation des températures (maximum 30°C). L’intensité de l’expression des symptômes est corrélée positivement avec la pluviométrie, considérée comme un facteur aggravant [160] et négativement avec un stress hydrique [161]. Spagnolo et al. (2014) [162], ont montré qu’au stade floraison la sensibilité de la vigne à une infection par des Botryosphaeriaceae était maximale. Cette sensibilité serait liée à l’état physiologique de la vigne caractérisé par l’inhibition de certaines réponses de défense et à une induction du métabolisme primaire.

III.3. Reproduction des symptômes d’Esca au niveau du bois et des feuille

La complexité de cette microflore est source d’une grande diversité et disparité de symptômes dans le bois, les feuilles et les baies des vignes symptomatiques de l’Esca. De nombreuses études ont permis de reproduire les symptômes observés dans le bois des ceps, par l’inoculation artificielle de Pch, Pmin et Fm, vérifiant ainsi le postulat de Koch pour les symptômes du bois [4]. D’autres études se sont intéressées à la sécrétion des métabolites secondaires, produits par les agents pathogènes de l’Esca et leur rôle potentiel dans l’expression des symptômes sur feuilles et fruits. A ce jour, la reproduction de symptômes aériens ressemblant à ceux de l’Esca n’a été réalisée qu’à partir de prélèvements de feuilles et de fruits, détachés des ceps contaminés [97,146,163,164].

A l’échelle de la plante entière, certains tests de pathogénicité réalisés ont permis de relier la présence de Pch et Pmin à l’apparition des symptômes foliaires [139,165–167].

Ainsi en Italie, Sparapano *et al.*, (2001) [168], ont pu observer des symptômes d'Esca dans le bois et les feuilles de vignes saines, deux ans après leur inoculation par Pch et Pmin. Néanmoins, le nombre de vignes inoculées ayant exprimé des symptômes foliaires dans cette étude reste faible. En Californie, Feliciano *et al.* (2004) [166], ont démontré que les symptômes sur feuilles et baies pouvaient être reproduits par inoculation de Pmin et Pch. Cette étude a été menée sur un cultivar particulièrement sensible à l'Esca, i.e. Thompson Seedless, et a nécessité trois années d'observation post-inoculation. La longue période d'incubation requise pour l'expression de la maladie, associée à l'utilisation de cultivars relativement tolérants, pourrait expliquer le faible impact de ces études dans l'expression des symptômes foliaires et de fruits [139,166,167].

Dans le cas du basidiomycète saprophyte Fm, la présence d'amadou ne provoque pas directement l'apparition de symptômes foliaires [87,132]. L'amadou est principalement observé dans les vignobles matures et se développe généralement à proximité de la moelle centrale, ou dans les zones où le bois fonctionnel a été colonisé par d'autres agents pathogènes. Bien que certaines observations indiquent que la présence de Fm a un impact sur la composition de la sève de vignes infectées par Pch et Pmin [163] son rôle dans l'expression de la maladie n'a pas été défini à ce jour.

III.4. Métabolites secondaires impliqués dans la pathogénicité

Il a été démontré que les champignons responsables de l'Esca produisent des métabolites secondaires phytotoxiques, potentiellement impliqués dans l'apparition des symptômes foliaires et le développement du dépérissement [38,169,170]. La synthèse de ces métabolites nécessiterait néanmoins, une longue période de colonisation préalable des champignons pathogènes [171]. Ces molécules, produites dans le bois des ceps infectés, seraient ensuite véhiculées par la sève brute du xylème et s'accumuleraient dans les feuilles et les fruits, provoquant l'apparition de symptômes [172,173].

Différents taxons microbiologiques ont été isolés à partir de ceps infectés par l'Esca et ont permis d'identifier et de caractériser les métabolites phytotoxiques produits par Pch, Pmin et Fm. Après purification, les différents composés isolés ont été testés sur des

protoplastes, des cals ou des feuilles prélevées sur des vignes infectées. Pch secrète des scytalones, des isosclérones, des composés phénoliques, des lactones et des acides benzoïques [143,172,174]. Pmin secrète également différents métabolites secondaires toxiques tels que des naphthalénones, des scytalones, des isosclérones, des flaviolines, la juglone (hautement toxique pour les plantes [175]) et des composés phénoliques [172,174,176]. Ces deux champignons produisent aussi des polysaccharides et des exopolysaccharides mais leur activité phytotoxiques n’a pas encore été démontrée [97,118,172]. Fm quant à lui produit différents métabolites secondaires dont des composés phénoliques, des composés terpéniques et du benzopyrane [174,177]. Par ailleurs, *E. lata* et différentes espèces de la famille des Botryosphaeriaceae produisent également une grande diversité de métabolites phytotoxiques [178] susceptibles d’aggraver le dépérissement des ceps infectés par l’Esca.

III.4.1. Mode d’action des toxines

Les naphthoquinones sont des métabolites cytotoxiques [179] capables d’inhiber les réactions de défense de la plante [180]. Le mode d’action de ces toxines produites par Pch et Pmin provient de leur pouvoir oxydant. La scytalone et l’isosclérone causent la peroxydation des lipides membranaires, connue pour intervenir dans le mécanisme de sénescence foliaire [181]. Des polypeptides toxiques, liés à l’augmentation du taux d’anthocyanine dans les feuilles pourraient également être impliqués dans ce processus de sénescence précoce [173]. Bien que la nature toxique de ces métabolites secondaires ait été démontrée, les mécanismes sous-jacents à l’apparition des symptômes foliaires n’ont pas été élucidés.

III.4.2. Enzymes de dégradation du bois

Les enzymes produites par les agents pathogènes responsables de l’Esca dégradent le bois et décomposent les molécules antimicrobiennes secrétées par la plante [173]. Toutefois, bien que Pch et Pmin partagent une même niche écologique, la caractérisation de leur activité enzymatique révèle des stratégies de colonisation bien distinctes [2]. Pch et Pmin, présentent *in vitro* des activités enzymatiques communes. Ils produisent des tannases, des laccases, des

peroxydases et sont capables d'utiliser l'acide tannique et le resvératrol, deux composés antifongiques naturellement présents dans le bois des vignes, comme source de carbone [2,173]. Cependant, d'autres activités enzymatiques impliquées dans la digestion des parois cellulo-lignifiées (xylanases, endo- β -1,4-glucanases, exo- β -1,4-glucanases, glucosidases, lignine peroxydase) ont été uniquement retrouvées dans les milieux de culture contenant Pmin [2,142]. Bien que l'activité enzymatique de Pch ne lui permette pas de dégrader les parois cellulaires, il possède une activité pectinolytique [144,182] qui lui permet de progresser dans les vaisseaux du xylème, même en cas d'occlusions vasculaires, la pectine étant le composant principal des gels et tyloses qui forment ces occlusions [144,145,173,182].

Fm excrète différentes enzymes de nature lignolytique (laccases, peroxydases, phénol-oxydases) [38] et cellulolytiques (β -glucosidases, 1,4- β -glucanases) [183] lui permettant de compléter la dégradation des tissus amorcée par Pch et Pmin, jusqu'à la formation d'amadou. D'autres agents pathogènes associés à l'Esca sont capables de sécréter une large gamme d'enzymes qui dégradent les parois cellulaires végétales [184]. A titre d'exemple, *E. lata* est connu pour cibler des polymères riches en glucose et produit des enzymes extra-cellulaires telles que des cellulases, des xylanases, des 1,3- β -glucanases, des chitinases, des protéases [185] et des lignine-peroxydases [186].

III.4.3. Action des bactéries

Chez la vigne, des bactéries ont été isolées dans l'ensemble des organes du cep, dont le bois, et leur capacité à se propager des racines jusqu'aux parties aériennes à été démontrée [187–190]. Certaines bactéries sont capables de promouvoir le développement mycélien [191] et pourraient jouer un rôle dans le dépérissement à l'Esca. D'autres, au contraire, possèdent des propriétés bénéfiques pour la plante et permettraient de limiter la colonisation de certains agents pathogènes [189,192,193]. A ce jour, plus de 200 espèces bactériennes différentes ont été isolées à partir de bois sains et nécrotiques prélevés sur des vignes symptomatiques de l'Esca, dont majoritairement des *Bacillus*, des *Pantoea*, des *Sphingomonas*, des *Erwinia* et des *Curtobacterium* [123]. La répartition des différentes communautés bactériennes varie en fonction du type de tissu colonisé. En effet, les tissus

asymptomatiques comportent principalement des Endobacterales et des Xanthomonadales alors que, dans les tissus nécrotiques les Bacillales sont majoritaires.

D'après Bruez (2013) [119] et Haidar et al. (2016) [194], les espèces isolées suggèrent que certaines pourraient avoir un rôle dans la protection du végétal, d'autres dans la dégradation des structures du bois, e.g. de la cellulose et hémi-cellulose, préparant ainsi le terrain aux champignons impliqués dans la dégradation des tissus ligneux, déjà présents à l'intérieur des ceps. Cependant, peu de données existent sur la répartition de ces différentes espèces de champignons dans le vignoble français, ou de manière plus fine sur leur distribution au niveau d'une plante. Des tests *in vitro*, ont mis en évidence l'effet inhibiteur de certains métabolites produits par *Bacillus subtilis* (souche AG1) sur la croissance de Pmin et Pch [195]. De nombreux travaux ont par la suite porté sur la caractérisation des bactéries capables de contrôler les espèces fongiques associées à l'Esca, *in vitro*, *in planta* et au champ [4,37]. A ce jour aucun produit commercial à base de bactéries, permettant de contrôler l'Esca au vignoble, n'a été homologué.

III.5. Facteurs biotiques et abiotiques influençant l'Esca

Le développement de l'Esca est lié à la combinaison de facteurs biotiques (microorganismes pathogènes, sensibilité variétale, âge des ceps) et abiotiques (sol, climat, pratiques culturales) [106,188]. Pour comprendre pourquoi un tissu de bois sain de ceps matures se nécrose, il convient de déterminer les facteurs favorisant l'activité pathogène des champignons et donc leurs aptitudes à dégrader les tissus du bois

III.5.1. Facteurs biotiques

III.6.1.1. L'âge

L'âge des ceps est un facteur important. L'Esca est un dépérissement qui s'exprime habituellement sur des vignes âgées d'au moins 8 ans [160]. Ce constat pourrait être corrélé à l'importance des plaies de taille [126] mais il semblerait que les jeunes plants soient également sensibles à l'infection [107,108,130].

III.6.1.2. La sensibilité variétale

L'incidence de l'Esca sur la vigne cultivée varie en fonction des cépages [5,80,108,117,129,144,197]. En effet, l'inoculation artificielle des agents pathogènes de l'Esca sur différents cultivars, combinée aux techniques de ré-isollement microbiologiques et à l'observation des décolorations vasculaires, a permis de démontrer l'existence de différentes sensibilités à la maladie [166]. Les observations effectuées dans le vignoble Français ont montré que toutes les régions viticoles étaient atteintes mais dans des proportions différentes en fonction du cépage, démontrant un effet du génotype sur l'expression des symptômes foliaires. Les enquêtes réalisées ont également permis de classer les cépages selon leur degré de sensibilité à l'expression des symptômes foliaire de l'Esca [129]. Ainsi, des cépages tels que le Cabernet-Sauvignon, l'Ugni Blanc ou le Trousseau, expriment plus facilement les symptômes de la forme GLSD que le Merlot, la Roussane ou le Pinot Noir. Noter que les vignes mères porte-greffes ne présentent généralement pas de symptômes foliaires sur la partie herbacée, mais des nécroses caractéristiques de l'Esca, peuvent être observées dans le bois.

Des observations préliminaires semblent indiquer qu'il existerait des clones dont la sensibilité à l'Esca est supérieure à la sensibilité globale de la variété. Cependant, aucun cépage totalement résistant n'a été identifié à ce jour. Travadon et al. (2013) [198], ont évalué la sensibilité de différents cultivars de *V. vinifera* et d'hybride de *Vitis* américain en comparant la formation de chancre produit par sept pathogènes associés aux MDB dont Pch. Parmi tous les cultivars testés, aucun génotype résistant n'a pu être mis en évidence. Plus récemment, Guan et al. (2016) [190], ont évalué la sensibilité de différents *Vitaceae* dont plusieurs accessions de *V. vinifera* subsp. *sylvestris* à *N. parvum* et *D. seriata*. Cette étude a révélé que certaines espèces de *V. sylvestris* présentaient un taux de nécroses plus faible après l'inoculation artificielle des agents pathogènes. Cette résistance aux *Botryosphaeriaceae* a ensuite été corrélée à une induction plus précoce, et plus intense de certains gènes de défense [191].

III.5.2. Facteurs abiotiques

III.6.2.1. Les conditions pédoclimatiques

La sensibilité à l’Esca d’une vigne, de même cépage et de même âge, dépend de son environnement pédoclimatique. La composition du sol détermine la vigueur de la plante, ce qui pourrait influencer l’incidence de la maladie au vignoble. En effet, les taux d’expression de symptômes les plus élevés sont observés dans les parcelles à fortes réserves utiles (alimentation en eau et en nutriments non limitant) et/ou ayant un statut azoté élevé [110,149, 191–193].

Le climat peut également impacter le taux d’expression d’une parcelle touchée par l’Esca. En effet, l’incidence de la forme GLSD est plus importante les années à printemps et étés doux et pluvieux alors que les étés chauds et secs sont favorables à l’apoplexie [117]. D’après Zufferey (2007) [203], l’alimentation hydrique de la vigne est déterminante pour le fonctionnement physiologique de base de la plante, croissance végétative et photosynthèse. Le rôle de l’eau est primordial durant tous les stades de développement végétatif et reproductif de la vigne, et sa disponibilité détermine les aspects quantitatifs et qualitatifs de la production : développement des baies, teneur en sucres, acidité, polyphénols et arômes [196]. L’intensité de l’expression des symptômes foliaires de l’Esca est corrélée positivement avec la pluviométrie, considérée comme un facteur aggravant [160], et négativement avec le stress hydrique [161]. Certains champignons associés à ce syndrome, notamment les champignons de la famille des *Botryosphaericeae*, se révèlent être des agents très agressifs dans certaines situations de stress hydrique [205]. La température peut aussi influencer la répartition géographique des agents pathogènes associés à l’Esca. Úrbez-Torres *et al.* (2011) [206], ont montré que les conidies de *Botryosphaeriaceae* infectant la vigne peuvent germer selon une gamme très large de températures, ce qui pourrait expliquer leurs aptitudes pathologiques dans les vignobles de l’hémisphère nord et sud.

III.6.2.2. Les pratiques culturales

D’autres facteurs agronomiques tels que la vigueur, la taille et le mode de conduite peuvent également influencer la vulnérabilité de la vigne à l’Esca [98]. De la pépinière jusqu’à la production en passant par la plantation, chaque intervention culturale, greffage, taille, influe sur plusieurs facteurs clés de la plante : évolution du microbiote, développement des agents pathogènes, formation de nécroses et dysfonctionnement des vaisseaux. Cette séquence d’événements est primordiale car l’importance du volume de bois fonctionnel nécrosé conditionne la probabilité d’apparition des symptômes foliaires et le dépérissement des ceps [112,196]. Il est donc capital de prévenir, limiter ou réduire le développement des nécroses d’Esca au cours de la vie d’un cep. Lors de cette introduction générale, une partie sera uniquement dédiée à la présentation des pratiques culturales agronomiques, utilisées au vignoble, pour contrôler l’Esca.

III.6. L’Esca et l’œnologie

Si l’Esca affecte la vigueur [207] et la longévité des ceps, cette maladie a aussi des conséquences sur la qualité du raisin et sur le produit final, le vin. D’une façon générale, la qualité du vin va dépendre des raisins: du volume de la baie, de la teneur et de la composition en polyphénols et acides et de son potentiel aromatique. Des analyses sensorielles ont montré que la présence dans les cuves de vinification de 5% de baies affectées par l’Esca, suffisaient pour altérer la qualité des vins finis, et faire apparaître des défauts olfactifs [6]. En particulier, des tests de dégustations triangulaires ont clairement mis en évidence que les juges distinguaient un vin témoin élaboré à partir de grappes saines, par rapport à un vin obtenu avec seulement 5 % de raisins issus de pieds atteints par l’Esca.

Les travaux de Lorrain et al. (2012) [6], ont montré que l’Esca induit des effets particuliers sur la composition phénolique des raisins et des vins. Pour deux millésimes consécutifs (2009, 2010) ces auteurs ont montré que l’Esca modifiait le profil phénolique des pépins et des pellicules de raisins. Des diminutions de la concentration de catéchine, d’épicatéchine et d’anthocyanes observées pourraient être attribuées à des perturbations physiologiques de la vigne, ou à une implication de ces composés phénoliques dans les

mécanismes de défense de la plante. De plus, un degré de polymérisation moyen des tanins plus faible (fraction polymérique des proanthocyanidines) a été observé dans les pellicules de raisins touchés par l'Esca. Ces maladies auraient donc un impact plus prononcé sur les pellicules que sur les pépins de raisin. Ceci résulte probablement d'un effet indirect des champignons associés à l'Esca [207]. Ces derniers affectent la physiologie de la vigne, la photosynthèse et pourraient également avoir un rôle sur la voie de biosynthèse des flavonoïdes. De plus, une laccase a été purifiée à partir de l'un des champignons agent de l'Esca [164]. Cette enzyme est capable d'oxyder de nombreux composés phénoliques et d'induire un stress oxydatif dans la plante. Ainsi, les proanthocyanidines et les anthocyanes pourraient être impliquées dans des mécanismes de défense de la plante, réagir avec la laccase du champignon et ainsi être dégradées.

IV. Impact de l'Esca sur l'anatomie et la physiologie de la vigne

Au-delà de l'identification et de la connaissance des différents bioagresseurs impliqués dans l'Esca, la mise en place de stratégies de lutte efficaces nécessite une meilleure compréhension des mécanismes de défense des ceps infectés. Magnin-Robert *et al.* (2011) [208], expliquent que la proposition de nouveaux moyens de lutte ne pourra se faire que suite à une compréhension plus fine de ces mécanismes, notamment via une reproduction artificielle des symptômes foliaires et une caractérisation des modifications anatomiques et physiologiques des plants symptomatiques.

IV.1. Particularités anatomiques de la vigne

IV.1.1. Le bois de la vigne

La vigne est une plante ligneuse dont le système de défense est similaire à celui employé par les arbres. Néanmoins, afin d'optimiser le transport de l'eau, et de limiter les phénomènes de cavitation induisant des embolies vasculaires, la vigne présente des adaptations fonctionnelles qui lui sont propres [209]. A titre d'exemple, le potentiel hydrique

racinaire de la vigne, supérieur (moins négatif) à celui mesuré sur arbre, permet de limiter la formation d'embolies vasculaires, par la dissolution progressive des gaz dans l'eau transportée par les vaisseaux [210]. L'état sanitaire d'un végétal ligneux dépend principalement de sa capacité à maintenir un cambium sain [211]. Le cambium correspond à une couche de cellules méristématiques dont les divisions forment le xylème secondaire et le phloème. La croissance du phloème est centrifuge, contrairement à celle du xylème. La couche de tissu la plus âgée se retrouve donc progressivement en périphérie du tronc jusqu'à être dégradée et participer à la formation de l'écorce [212]. Chaque année, une nouvelle couche tissulaire de xylème secondaire et de phloème est générée. Le cambium est donc un tissu clé, assurant le développement annuel de nouveaux tissus vasculaires et la régénération des différentes couches composant le tronc des ceps [204].

IV.1.2. Le modèle CODIT : compartimentation de la pourriture dans le tronc

En réponse à une agression par des agents pathogènes, la plante met généralement en place un mécanisme de défense complexe afin de limiter leur progression. Celui-ci consiste en une série de modifications anatomiques se traduisant par la formation de compartiments étanches qui isolent la zone atteinte [213]. Différents modèles ont été suggérés afin d'expliquer le phénomène de résistance mis en place au niveau du tronc ou du bois des plantes ligneuses : le modèle de la restriction micro-environnementale [214], le modèle « zone de réaction » [208] et le CODIT (Compartmentalization Of Decay In Tree) [213].

Concernant les espèces ligneuses, le modèle CODIT permet d'expliquer les mécanismes sous-jacents à l'apparition de blessures comme la mise en place de nouveaux tissus cicatriciels et le cloisonnement des zones infectées par des agents pathogènes vasculaires. En effet, la compartimentation correspond à la mise en place de barrières non spécifiques, permettant de limiter la progression des pathogènes vasculaire et de préserver le cambium. Cependant, le parenchyme axial formé lors de la cicatrisation des plaies ne constitue pas un tissu vasculaire per se. Ainsi le remplacement du xylème par ces barrières parenchymateuses non hydro-actives pourrait accentuer la sensibilité au stress hydrique des ceps ayant une forte proportion de bois infecté [211]. Dans leur modèle CODIT, ces auteurs décrivent quatre types de barrières dont les trois premières servent à restreindre la progression des microorganismes dans le bois présent au moment de la blessure.

Les barrières du modèle CODIT (Fig 7) se mettent en place en deux étapes :

1. la formation des barrières de type 1, 2 et 3 dans le bois directement affecté par une blessure. Ces barrières constituent des zones de réactions, caractérisées par de nombreux échanges chimiques conduisant à l'accumulation de subérine, d'eau, de composés antifongiques ou de polyphénols ;
2. la formation d'une barrière de type 4 par le cambium vasculaire.

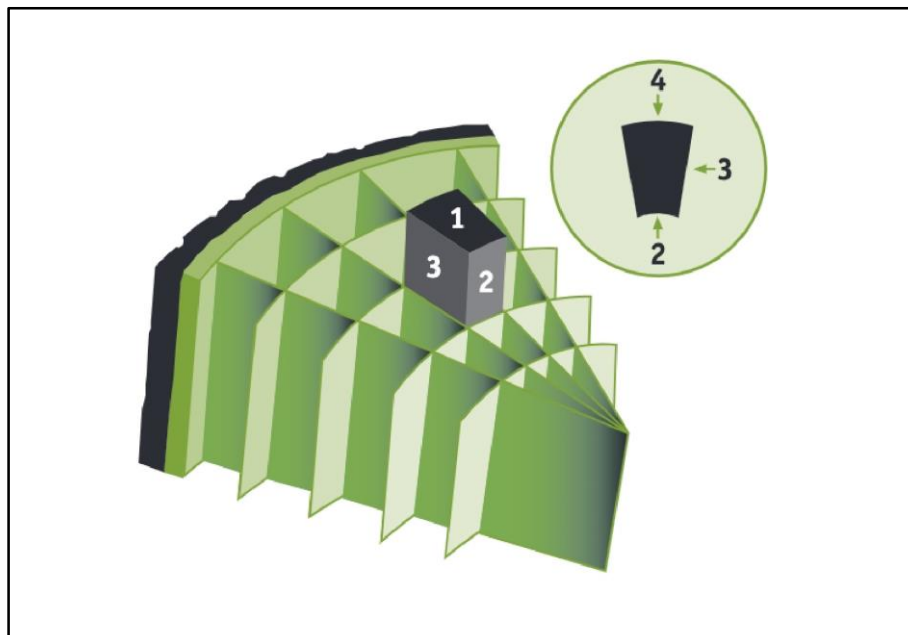


Figure 7: Modèle CODIT montrant l'emplacement des quatre murs dans le bois. (Adapté de Shigo et Marx 1977).

Le rôle de chacune des 4 barrières est le suivant :

- **La première barrière** est constituée de gomme, de pectine, de callose et de thylls servant à l'occlusion des vaisseaux et à l'isolement vertical des microorganismes pathogènes afin de limiter leur progression. Ce premier mur discontinu, constitue la plus faible des barrières.
- **La seconde barrière** est attribuée aux caractères morphologiques des cellules

localisées autour de la moelle. Cette barrière est continue sur toute la longueur de la vigne et limite l'expansion radiale des microorganismes.

- **La troisième barrière**, plus hermétique que les deux précédente mais pouvant présenter des discontinuités, est constituée de faisceaux ligneux, tissus vivants du bois, qui peuvent déclencher des réactions de défense de la plante. Cette barrière permet de limiter le développement latéral des agents pathogènes.
- **La quatrième barrière**, la plus sélective et la plus importante, consiste en une zone de barrage formée par le cambium vasculaire après chaque blessure infligée au bois de la vigne. Cette barrière isole le bois attaqué de celui qui sera formé par la suite et empêche la progression des champignons. La différenciation du cambium vasculaire en parenchyme formant la barrière de type 4 dépend de la taille de la blessure, de son type et des conditions climatiques [213]. Dans la littérature ce tissu, désigné sous le terme de périoderme nécrophylactique [216] est capable de protéger les tissus sains des tissus infectés jusqu'à l'année $n + 1$ après l'infection.

L'observation macroscopique du phénomène de compartimentation de l'infection est décrite comme aspécifique aux agents pathogènes colonisant les plaies [217]. Néanmoins, l'évolution des défenses induites chez les plantes génère des interactions hôte-pathogène spécifiques [218]. Par conséquent la description générale de la mise en place de la compartimentation par le modèle CODIT appliqué à la vigne pourrait intégrer un certain niveau de spécificité. Chez les gymnospermes, la contamination d'une plaie par un agent pathogène retarde la mise en place du périoderme nécrophylactique et réduit l'intensité de la subérisation des tissus [219–221]. Clarifier le niveau de spécificité de la réponse du bois face à l'infection est un élément clé à considérer pour comprendre le rôle de chaque agent impliqué dans le pathosystème complexe que représente l'Esca [4]. La production de gomme, associée à la barrière 1 du CODIT a été observée en réponse à l'Esca [222] dans les tiges et les racines. Par ailleurs, certains auteurs ont montré que l'inoculation de Pmin et de Pch entraîne une obstruction des vaisseaux des racines, des tiges ou du cep entier par des thylls, également associés à la barrière 1 du CODIT [96,186]. Toutefois, l'observation de coupes histologiques issues de plaies de vignes infectées par Pch ou Pmin est différente [142,223], ce qui pourrait confirmer l'hypothèse d'un mécanisme de compartimentation spécifique en

fonction de l'agent pathogène colonisateur.

La formation de ces barrières représente un coût énergétique substantiel pour la plante. Ainsi, la multiplication des zones lésées par les nécroses impacte le fonctionnement vasculaire du cep. Cela peut entraîner un affaiblissement généralisé de la plante qui devient alors incapable de se défendre efficacement contre les champignons pathogènes.

IV.2. Complication pathologique : dysfonctionnements vasculaires causés par les phénomènes de cavitation, d'embolie et de tyloses

Les travaux de recherche entrepris ces dernières années en France et à l'étranger sur l'Esca ont porté sur de nombreux points et ont impliqué des disciplines scientifiques très différentes. On peut citer : l'épidémiologie (dont la détection précoce de la maladie), les relations hôte-pathogènes (dont l'induction de résistance), la connaissance du cycle de vie des agents pathogènes et de leurs fonctions (dont la production de pathotoxines), l'écologie microbienne via l'étude du microbiote, de sa composition et son évolution au cours du temps. La recherche de moyens de protection a surtout ciblé des expérimentations sur les pratiques culturales, le biocontrôle.

A l'exception des travaux de Pouzoulet *et al.* (2014) [224], très peu d'études ont été consacrées à l'écophysiologie des ceps atteints par l'Esca : le dysfonctionnement du système vasculaire qui est suspecté chez les ceps malades et les conséquences que cela induirait sur l'acquisition des ressources en eau et carbone par la vigne n'a, à notre connaissance, pas ou peu été abordé. Selon Carbonneau *et al.* (2007) [225], ces axes de recherches sont pourtant très importants car le flux de sève brute est extrêmement sensible aux changements de perméabilité du xylème, ainsi qu'aux variations brusques de la tension de sève intravasculaire. Ces changements hydrauliques, exacerbés en périodes d'augmentation de la demande hydrique atmosphérique et de diminution de la teneur en eau du sol [226,227], entraînent la formation d'embolies vasculaires. Comme il a été montré lors d'attaques de pathogènes externes chez certains ligneux, la rupture du courant de sève par ces bulles d'air

peut complètement bloquer la circulation de sève et entraîner la perte de capacité hydraulique de l'aubier et induire *in fine* la fermeture des stomates [227].

Sous certaines conditions atmosphériques, température élevée et faible hygrométrie, Adrian et Fournioux (2011) [228], indiquent qu'un accident encore plus grave peut survenir : une transpiration excessive au niveau du feuillage peut provoquer une dépression dans le système circulatoire menant à la formation de thylls. En conséquence, dans le cas de l'Esca, cette rupture hydraulique perturberait la photosynthèse, réduirait l'assimilation de CO₂ et la fabrication de sucres et autres composés secondaires nécessaires aux mécanismes de défense contre le pathogène. Si un trop grand nombre de vaisseaux est touché, le cep pourrait mourir rapidement par apoplexie. Sous certaines conditions climatiques critiques, une plante qui dispose d'un nombre limité de vaisseaux fonctionnels pourra donc beaucoup moins bien s'adapter à son environnement. Suite à une comparaison morphologique et anatomique détaillée des rameaux lignifiés de trois cultivars de vigne, Pouzoulet *et al.* (2014) [224], ont émis l'hypothèse que la sensibilité des cépages à l'Esca dépendrait de la taille des vaisseaux fonctionnels. En effet, le Merlot, le plus tolérant des trois cépages, présentait les vaisseaux de plus faible diamètre, alors que le Thompson Seedless, le plus sensible, présentait les vaisseaux de plus grand diamètre. Le Cabernet-Sauvignon, de sensibilité moyenne, présentait des vaisseaux dont le diamètre était intermédiaire par rapport aux valeurs trouvées chez les deux autres cépages. Ces auteurs ont donc émis l'hypothèse, que des cépages présentant des vaisseaux de faible diamètre comme le Merlot, pourraient être en mesure de limiter plus efficacement, la propagation de phytotoxines émises par les champignons pathogènes, notamment via une occlusion des vaisseaux par des gels et des thylls, plus rapide et moins délétère pour le cep.

IV.3. Perturbation de l'activité de différents organes de la vigne

Comme énoncé ci-avant, la dégradation de l'état sanitaire des ceps infectés par l'Esca liée à la formation de nécroses dans le bois par les champignons pathogènes peut être la source d'un dysfonctionnement du système circulatoire du cep. Cependant, peu d'études ont porté sur l'identification des paramètres impliqués dans ce déséquilibre vasculaire. Les symptômes foliaires observés au vignoble, peuvent être considérés comme la conséquence

du développement de nécroses et de l'émission de toxines par les champignons pathogènes, véhiculées jusqu'aux organes herbacés par les vaisseaux fonctionnels [208]. Maher *et al.* (2012) [112], ont montré que la forme apoplectique contenait au niveau des bras et du tronc, un volume de bois fonctionnel significativement plus altéré que chez les ceps asymptomatiques ou exprimant la forme lente de l'Esca. A ce titre, les symptômes foliaires de la forme lente de l'Esca sont associés dans 77,4% des cas avec au moins 10% d'amadou dans les ceps [114].

Depuis quelques années des études s'intéressent à l'évolution de la physiologie de la plante au cours du développement de la maladie, notamment vis-à-vis du métabolisme carboné. Celui-ci a été choisi car son fonctionnement approprié est vital pour la pérennité de la plante et les perturbations précoces sont donc des indicateurs de stress [208]. Une augmentation de l'expression des symptômes foliaires a été observée chez des plants infectés par l'Esca et traités par des bioactivateurs ou des biostimulants. Cette surexpression du syndrome GLSD de l'Esca pourrait être la conséquence d'une augmentation du transport des toxines produites par les agents pathogènes jusqu'au feuilles [229,230]. En effet, les principaux dysfonctionnements physiologiques associés à l'Esca concernent le métabolisme carboné et les réactions de défense, qui ont lieu dans les différents organes de la plante. Dans le tronc, la colonisation des champignons pathogènes de l'Esca, dégrade les réserves d'amidon. Dans les feuilles, où les agents pathogènes ne sont pas présents, le métabolisme carboné est affecté par une baisse de l'activité photosynthétique. Ainsi le dépérissement des plants infectés par l'Esca pourrait être amplifié par la consommation des réserves carbonées de la plante par les agents pathogènes. La synthèse des lipides et des acides aminés, semble également réduite chez les ceps infectés. La perturbation du métabolisme primaire de la plante est souvent associée à l'induction de mécanismes de défense. A titre d'exemple, le développement de barrières biochimiques, résultant de l'accumulation de gommés et de thylls permet, par l'occlusion des vaisseaux fonctionnels infectés, de limiter la progression des agents pathogènes. Leur colonisation dans le bois est également inhibée par la formation de zones réactionnelles riches en polyphénols et par l'accumulation de protéines liées à la pathogénèse (PR).

IV.3.1. Impacts sur la maturation des baies

L'Esca modifie la maturation des baies et le métabolisme des flavonoïdes, responsable de la production d'anthocyanes et de tannins [6]. Il en résulte une diminution du taux de sucres et de la production de composés phénoliques, entraînant une baisse de la qualité organoleptique des baies [6,38,106,231–233]. Par ailleurs, en réponse à la sécrétion de composés extracellulaires phytotoxiques par les champignons pathogènes, la vigne met en place un processus de détoxification. Il en résulte une baisse de la qualité organoleptique des baies infectées et du vin qui en résulte. Les baies présentant plus de 25% de symptômes d'Esca, sont caractérisées par un plus faible taux de sucre dans les moûts, une augmentation de l'acidité, de la teneur en azote, et du taux de minéraux, de resveratrol, d'acide tartrique et d'acide malique [6,233]. Par ailleurs, dans les baies infectées, une surexpression de gènes de défenses impliquant des protéines liés à la pathogénèse (PR-P) comme la PR-5, la PR-10 et la polyphénol-oxydase (PPO) [234]. En effet, les baies infectées sont exposées à différents stress oxydatifs pouvant altérer la synthèse de protéines telles que l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH2) et la cystéine synthase, impliquées dans la production de composés aromatiques [234].

IV.3.2. Impact physiologique sur les feuilles

La physiologie des feuilles symptomatiques semble fortement impactée. En effet, des dysfonctionnements physiologiques associés à une fermeture des stomates, et une altération de l'appareil photosynthétique, ont été observés [235]. Petit *et al.* (2006) [207], puis Felgueiras *et al.* (2007) [236], ont étudié l'altération de l'appareil photosynthétique en fonction de l'intensité de l'expression foliaire de la forme lente de l'Esca. Cette altération se traduit par (i) une diminution de l'assimilation de CO₂ et de la transpiration ; (ii) une chute de l'activité photosynthétique, associée à une perturbation de la fluorescence et du fonctionnement des photosystèmes (PSII); (iii) une diminution de la concentration en pigments chlorophylliens malgré un taux de caroténoïdes stable [207,208]. La diminution du taux de chlorophylle et de la fluorescence a également été observée *in vitro* sur des feuilles symptomatiques infectées par Pch [197]. La conséquence directe de cette diminution de la photosynthèse est une chute des réserves carbonées dans les sarments. L'année suivante, les

faibles réserves peuvent entraîner une baisse de vigueur de la plante, affectant son développement végétatif et reproducteur.

Aucun dysfonctionnement de l'appareil photosynthétique n'a été mesuré sur des feuilles saines issues de rameaux sains mais une baisse progressive de la photosynthèse nette (P_n) a été mesurée sur des feuilles saines, issues de rameaux symptomatiques [207,208]. En effet, le niveau d'altération des échanges gazeux semble corrélé au niveau de développement des symptômes foliaires de l'Esca. Les feuilles saines, appartenant à des rameaux symptomatiques, présentent une légère baisse de photosynthèse et de conductance stomatique, tandis que ces paramètres sont fortement altérés au niveau des feuilles présentant la forme GLSD. En complément de ces travaux, Christen *et al.* (2007) [237], ont observé que cette diminution de l'activité photosynthétique, pouvait être détectée deux mois avant l'expression des symptômes foliaires, chez le Cabernet-Sauvignon. Ce phénomène pourrait être dû à une baisse d'activité des enzymes photosynthétiques comme l'anhydrase carbonique, qui catalyse la conversion du CO_2 en HCO_3^- , ou à des enzymes impliqués dans la dégradation de photoassimilats [238].

Au niveau des feuilles saines de rameaux symptomatiques, des observations histologiques ont mis en évidence des dommages de la structure des organelles et des grains d'amidon, probablement liés au déclin de la P_n . Au niveau cellulaire, les parties vertes des feuilles symptomatiques présentent des plastides contenant des grains d'amidon de taille réduite, des granas sous-développées, et des thylakoïdes allongés. Ces modifications anatomiques entraînent une diminution de la synthèse de glucides [239]. Ces dégradations intracellulaires sont particulièrement visibles dans les parties chlorotiques des feuilles symptomatiques, où les cellules végétales présentent des altérations du tonoplaste [240].

Les mécanismes de défense sont également impactés : au niveau de la voie du glutathion, de la synthèse de protéines de défense (PR) et de la production de composés phénoliques [240]. Une augmentation progressive de la teneur en resveratrol et d'autres composés phénoliques a été observée au fur et à mesure de l'apparition des symptômes d'Esca [208,239,241–243]. Ces différentes études ont montré que des modifications cellulaires interviennent au niveau des feuilles de ceps infectés, avant que les symptômes foliaires ne soient visibles. Ces modifications sont associées à un réacheminement des

ressources carbonées et énergétiques du métabolisme primaire vers le métabolisme secondaire pour les feuilles symptomatiques. Selon Letousey *et al.*, (2010) [244], l'étude de la forme foudroyante de l'Esca montre que les mécanismes photosynthétiques sont fortement perturbés 7 jours avant que les feuilles ne deviennent apoplectiques. Alors qu'aucun signe visuel ne permet de dire que la plante va prochainement exprimer des symptômes foliaires, des modifications physiologiques sont détectées : une chute brutale de l'assimilation du CO₂, la fermeture des stomates, une baisse de l'activité du photosystème II et une diminution de la transcription de certains gènes associés à la photosynthèse. A l'inverse, certains gènes de défense sont surexprimés dans les feuilles 7 jours avant et pendant l'expression visible des symptômes sur la plante. La plante est donc en état de stress avant l'expression visible de la maladie et active certaines défenses.

L'altération du transport hydrique dans la plante serait corrélée à des dysfonctionnements du xylème [245]. La forme apoplectique est souvent associée à une combinaison d'excès d'eau dans le sol et des températures élevées [246] conduisant à un déséquilibre entre transpiration (ouverture stomatique) et absorption d'eau par les racines. Au vignoble, une chute significative de l'efficacité des échanges gazeux, et de l'efficacité d'utilisation en eau a été observée sur des feuilles asymptomatiques de ceps présentant la forme GLSD, 7 jours avant qu'un épisode apoplectique ne survienne. Edwards *et al.*, (2007) [141], ont observé une diminution de la conductance stomatique entraînant un déficit hydrique chez des boutures de 3 ans, maintenues sous serre, et infectées artificiellement par Pch. De plus, une étude comparative de la fluorescence chlorophyllienne d'une plante exprimant l'Esca avec celle subissant un stress hydrique a révélé deux fonctionnements différents du photosystème II [237]. Il a donc été conclu que l'expression de la forme GLSD de l'Esca ne pouvait pas simplement être corrélée à un stress hydrique, mais qu'elle était plus complexe [244,247]. A ce titre, une baisse significative de l'expression de gènes impliqués dans la fluorescence et dans la synthèse de protéines de défenses (PR) a été mesurée sur des feuilles saines de ceps symptomatiques, 7 jours avant l'apoplexie [244].

IV.3.3. Perturbation physiologique des rameaux

Des modifications structurales des rameaux de plants affectés par la forme GLSD de l’Esca ont été reportées [235,248], notamment via la mise en place des 3 premières barrières du modèle CODIT [249]. Ces auteurs ont également observé des dégradations du cambium vasculaire ainsi que la présence de lésions foliaires subérisées au cours de la saison végétative. Les dépôts de suber, élicités par l’attaque de champignons pathogènes, pourraient être affectés par les métabolites secondaires produits par ces espèces fongiques pathogènes, et véhiculées dans les rameaux des ceps atteints du syndrome GLSD de l’Esca [248]. En effet, l’hypothèse principale sur l’apparition des symptômes foliaires de la forme GLSD, repose sur le transport de métabolites phytotoxiques, émis par les agents pathogènes colonisateurs du bois, via les vaisseaux conducteurs de sève qui parcourent la totalité du cep [4,143,250].

Spagnolo *et al.* (2012) [251], ont étudié le profil protéomique de rameaux provenant de ceps exprimant les formes lente et apoplectique de l’Esca par électrophorèse bidimensionnelle. Des signatures protéomiques spécifiques ont été décrites pour les rameaux symptomatiques ou asymptomatiques pour des protéines impliquées dans le métabolisme primaire, la production d’énergie, la réponse au stress et l’induction de défenses. La synthèse d’ATP est particulièrement stimulée dans les rameaux des plants malades et les protéines impliquées dans la respiration cellulaire comme la succinate déshydrogénase, la pyruvate carboxylase et la malate déshydrogénase cytosolique, y ont été retrouvées en grande quantité. Ces résultats confirment que le métabolisme carboné joue un rôle clé dans l’activation des défenses de la plante [252,253] et qu’il nécessite une dépense énergétique considérable de la plante hôte [254]. Des protéines de détoxification spécifiques ont également été retrouvées en abondance, dans les rameaux de ceps symptomatiques, comme la glutathion S-transférase (GST). Une surexpression du gène GST1 codant pour cette protéine a été décrite par Letousey *et al.* (2010) [244], et Magnin-Robert *et al.* (2011) [208], dans les feuilles de plants apoplectiques et GLSD. Par ailleurs, une accumulation d’ARNm codant pour les gènes GSTU1 et GSTF2, a été rapportée par Valtaud *et al.* 2009 [2,240], dans les feuilles pré-symptomatiques de ceps atteints de la forme GLSD. A la lumière de ces découvertes, l’importance de la voie de synthèse du glutathion dans la réponse au stress, ainsi que son rôle dans la détoxification des métabolites secondaires a été confirmée [240,251,255].

Un déficit dans la production de deux enzymes impliqués dans le système de détoxification des ceps, la superoxyde dismutase et l'ascorbate peroxidase, a été observé chez les rameaux symptomatiques [251]. La faible proportion de ces deux enzymes indiquerait que le système de détoxification de la vigne n'est pas suffisant pour contrer le stress oxydatif provoqué par l'émission des phytotoxines produits par les champignons pathogènes. Une répression de gènes codant pour la synthèse de protéines liées à la pathogénèse (PR-5) et qui stimulent la synthèse de thaumatine et d'osmotine, deux substances antifongiques [256–259], a été mesurée dans les rameaux des ceps malades. Cette perturbation physiologique interviendrait dans le mécanisme de défense de la plante bien qu'aucune souche fongique associée à l'Esca n'ait pu être isolée dans les échantillons de feuilles ou de rameaux symptomatiques. On peut aussi mentionner que deux protéines de choc thermique de faible poids moléculaire (smHSPs) seraient absentes dans les rameaux symptomatiques. Les smHSPs, sont des protéines chaperon, accumulées suite à un stress thermique [260,261] qui maintiennent l'intégrité de protéines partiellement dénaturées, limitent la formation d'agrégats, et empêchent la perte définitive de leur fonction [260]. Les protéines HSPs pourraient également limiter les dégâts causés par l'accumulation de composés oxydatifs [262]. La répression des gènes codant pour ces différentes protéines expliquerait la sensibilité des ceps aux stress oxydatifs provoqués par la synthèse des métabolites phytotoxiques, possiblement à l'origine de l'apparition des symptômes foliaires.

IV.3.4. Perturbations physiologiques liées à la décoloration des tissus du tronc

Magnin-Robert *et al.* (2014) [263], ont analysé le profil protéomique des tissus sains et nécrosés de ceps infectés par l'Esca. Une surexpression d'un large panel de protéines impliquées dans le métabolisme primaire, la tolérance au stress, et dans les réponses de défense, a été identifiée. Parmi ces protéines, certaines sont issues de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes [264], d'autres du système de détoxification [265], et plusieurs PR protéines [258] ont été retrouvées dans les nécroses de ceps symptomatiques. Ces résultats indiquent qu'une réponse de défense spécifique, induite par la colonisation des agents pathogènes de l'Esca, est activée dans le bois des plants malades [235]. Cette réponse est d'autant plus marquée chez les ceps exprimant des symptômes foliaires. Concernant les HSP, des résultats similaires à ceux obtenus dans les rameaux ont été décrits, confirmant leur rôle

dans la résistance de la plante au stress [258]. Au travers de l'analyse protéomique dans les différents tissus affectés par l'Esca, une surabondance, ou à contrario, un déficit de certaines protéines clés du métabolisme de la plante, ont été identifiés. Ces protéines constitueraient un facteur limitant chez les plants symptomatiques et participeraient à l'expression des symptômes foliaires.

IV.4. Mouvements de l'eau dans le continuum sol-plante-atmosphère (CSPA) et régulation stomatique

Du point de vue des transferts hydriques, le sol, la plante et l'atmosphère forment un continuum [266]. L'eau en provenance du sol est absorbée au niveau des racines et transite par les vaisseaux fonctionnels de la plante avant de rejoindre l'atmosphère en s'évaporant par les stomates des feuilles. La transpiration au niveau des feuilles induit une tension qui est le moteur principal du transfert de l'eau dans la plante. Elle crée un appel qui est retransmis dans le système vasculaire grâce aux forces de cohésion de l'eau (théorie de la tension-cohésion de l'ascension de la sève brute ; Dixon & Joly 1894 [267]). D'après Zufferey & Murisier (2004) [268], le continuum sol-plante-atmosphère est parcouru par des résistances au transfert de l'eau : résistance hydraulique de la part du sol et de l'interface sol-racine, résistance dans la plante, depuis la racine jusqu'aux feuilles et résistance stomatique. Les plantes tentent de maintenir la différence de potentiel entre les feuilles et les racines en deçà du seuil de cavitation. La régulation stomatique constitue en effet un moyen de réguler les flux d'eau dans la plante pour assurer le fonctionnement du métabolisme et la croissance du végétal, mais aussi pour lutter contre le phénomène de cavitation.

Les stomates ont un rôle clé dans la régulation des flux d'eau et de CO₂ des feuilles. Ils constituent le moyen de contrôler les pertes d'eau par la transpiration et le prélèvement de CO₂ nécessaire à la photosynthèse. Les mouvements stomatiques, ouverture et fermeture, dépendent des variations de turgescence des cellules de garde et des cellules épidermiques voisines. La turgescence résulte, soit d'une variation du potentiel hydrique des cellules de garde (phénomène passif), soit d'une variation active du potentiel osmotique de celles-ci. De nombreux facteurs externes (i.e. présence de lumière, taux de CO₂, température, hygrométrie, état hydrique du sol) et internes (i.e. hormones végétales et état hydrique du végétal) influent sur le fonctionnement des stomates [228,269].

IV.4.1. Régulation des mouvements stomatiques

Les stomates sont des pores situés sur l'épiderme des parties aériennes des plantes. Ils sont constitués de deux cellules de gardes entourant un orifice appelé ostiole. La paroi des cellules stomatiques est dissymétrique et plus épaisse du côté interne. Les stomates contrôlent deux des plus importants processus des plantes : la photosynthèse et la transpiration. De par leurs fonctions, ils sont essentiels pour la croissance des plantes et le rendement des cultures. La régulation de la conductance stomatique a un rôle clé dans l'adaptation de la vigne aux variations des conditions environnementales, notamment en situation de stress. La conductance stomatique régule en effet l'entrée de CO₂ et les pertes d'eau au niveau des feuilles. En fonction des conditions climatiques et afin d'optimiser les échanges gazeux, les variations de facteurs environnementaux entraînent la fermeture ou l'ouverture des stomates.

L'ouverture des stomates est provoquée par la force motrice liée à l'augmentation du volume des cellules de garde et la pression de turgescence causée par une entrée d'eau dans l'apoplasme. Ces flux d'eau accompagnent l'accumulation d'ions K⁺ provoquée par une hyperpolarisation de la membrane, suite à l'activation d'une pompe à proton [270,271]. L'ouverture stomatique est ensuite maintenue par l'accumulation des sucres. La fermeture des stomates résulte d'un processus inverse, impliquant en plus le calcium (Ca²⁺). Plusieurs facteurs comme l'acide abscissique (ABA) ou une hausse de la concentration en CO₂ peuvent stimuler l'absorption de Ca²⁺ ce qui entraîne une dépolarisation de la membrane puis une sortie d'ions Cl⁻ et malate²⁻ et une diffusion passive des ions K⁺ [272,273]. Les flux d'ions permettant les mouvements stomatiques nécessitent la participation de nombreux canaux plasmiques et vacuolaires [274].

IV.4.2. Caractérisation de la réponse stomatique face à différents stress

Les stomates sont sensibles aux variations de température et de déficit en vapeur d'eau de l'air (VPD), deux paramètres liés et dont les effets sont difficilement séparables. Si certaines espèces apparaissent plus ou moins sensibles aux variations de VPD, on observe cependant une réponse commune : la conductance stomatique baisse avec l'augmentation du

VPD [275,276]. Le mécanisme de réponse des stomates aux variations de VPD est peu connu, alors que ce paramètre environnemental est un facteur dominant par rapport aux variations de lumière ou de concentrations de CO₂, ce qui lui donne une grande importance dans la prédiction des mouvements stomatiques [277]. Pour la température, on observe un optimum et la conductance baisse lorsque l'on s'éloigne de celui-ci [278]. Le contrôle de la réponse stomatique aux variations de température semble lié à la respiration [279].

Comme il a été montré lors d'attaque de pathogènes externes chez certains ligneux, la rupture du courant de sève par ces bulles peut ainsi complètement bloquer la circulation (embolie) de sève et entraîner la fermeture des stomates [280]. En conséquence, cette rupture hydraulique due à l'Esca réduira l'assimilation de CO₂ et la fabrication de sucres et autres composés secondaires nécessaires pour se défendre contre le pathogène. Edwards *et al.* (2007) [281] ont observé une diminution de la conductance stomatique entraînant un déficit hydrique chez des plantes infectées par Pch.

V. Pratiques agronomiques et stratégies de lutte contre l'Esca

Les connaissances accumulées sur les moyens de lutte contre les maladies du bois de la vigne reposent à la fois sur des approches scientifiques et empiriques. Les sources d'informations sont très diverses, i.e. des scientifiques, techniciens, entreprises privés, viticulteurs, etc, délivrent des résultats et opinions sur cette problématique. Ce qui rend complexe l'identification des pratiques agronomiques, chimiques et biologiques les plus efficaces, car toutes ne présentent pas des conditions préalables à la validation scientifique. Toutefois, cette richesse d'informations est un élément moteur pour l'élaboration de projets de recherche, à même de valider, nuancer ou rejeter les différentes hypothèses sur les méthodes de gestion des maladies du bois de la vigne.

V.1. Généralités

L’importance du volume de bois nécrosé conditionnerait la probabilité d’apparition des symptômes foliaires [196] et, plus le volume d’amadou est important, plus grande serait la probabilité d’apparition de symptômes de type apoplexie [112]. Il est donc capital de prévenir, limiter ou réduire le développement des nécroses d’Esca au cours de la vie d’un cep. De la pépinière jusqu’à la production en passant par la plantation, chaque intervention culturale (e.g. greffage, taille) va influencer sur le développement des nécroses associées à l’Esca. Des systèmes de taille respectant les vaisseaux, et donc les flux de sève, et préservant de ce fait la vigne de l’Esca ont ainsi été préconisés par Poussard dès le début du 20^{ème} siècle en Charentes avant d’être popularisés par René Lafon (1921) [282].

Concernant les moyens de protection de la vigne contre l’Esca, la variété des sources d’inoculum d’agents fongiques pathogènes, et le développement très lent et non visible des champignons dans le bois, rendent très difficiles la mise en œuvre des méthodes de lutte. De plus, l’évolution de la réglementation des produits phytosanitaires a conduit à l’interdiction en 2001 en France, puis en 2003 en Europe, de l’arsénite de sodium, en raison de ses effets cancérogènes sur l’Homme et de sa forte toxicité pour l’environnement [283]. Or, ce produit était le seul homologué, permettant de lutter efficacement contre l’Esca au vignoble. A l’heure actuelle, des produits biologiques, à base de micro-organismes, ou des produits naturels à base d’extraits de plantes, sont pour quelques uns homologués ou en cours d’étude. Cependant leur efficacité est variable d’une année à l’autre et le niveau d’efficacité est beaucoup plus faible que celui de l’arsénite de sodium. Actuellement aucune méthode ne peut réellement arrêter le développement de ces pathologies et les seuls moyens de lutte à disposition des viticulteurs sont les moyens de lutte culturels ou prophylactiques. Ce point constitue donc un verrou scientifique et technologique majeur dans la lutte contre l’Esca de la vigne.

Les informations sur les mesures de contrôle sont limitées et varient selon les régions géographiques. L’éradication complète n’étant pas possible, le contrôle est donc principalement axé sur la prévention et l’atténuation des symptômes de ces maladies [206]. La chirurgie réparatrice constitue la principale stratégie de gestion utilisée par les industries viticoles pour lutter contre l’Esca [284–286]. Cependant, cette opération peut représenter un

investissement économique substantiel pour les exploitations [287]. En conséquence, l'évaluation de nouveaux principes actifs, souvent des agents de biocontrôle, et de pratiques culturales susceptibles de réduire efficacement l'infection causée par les agents pathogènes de l'Esca, a été la principale priorité du secteur viticole et des chercheurs au cours de la dernière décennie [206,286]. Certains viticulteurs et acteurs de cette profession sont d'ailleurs à l'origine des hypothèses actuellement au cœur de nombreux projets de recherche scientifique.

Face à l'absence de moyens curatifs contre les maladies du bois, deux stratégies de contrôles sont actuellement employées au vignoble : (i) des techniques prophylactiques permettent de limiter les risques d'infections pour les ceps qui n'ont pas encore exprimés de symptômes alors que (ii) des techniques post-infections sont déployées pour ralentir l'action des pathogènes, une fois le cep contaminé.

V.2. Méthodes préventives

Les mesures prophylactiques ont pour objectif de réduire la quantité d'inoculum et de diminuer les risques de contamination. Les bois morts, les sarments et résidus de tailles laissés au sol représentent des sources d'inoculum, il est donc important d'éliminer ces foyers d'infection potentielle. Le travail du sol permet également d'enfouir ces débris contaminés et de rompre le cycle de développement des champignons. Parmi ces mesures, l'adaptation des pratiques de tailles, pour limiter le risque d'infection des ceps, est au cœur des préoccupations de la profession viticole et du monde de la recherche.

V.2.1. La taille Guyot-Poussard, une taille historique

Le lien entre la qualité de la taille et la quantité de tissus sains, c'est-à-dire non dégradés par les champignons pathogènes impliqués dans les maladies du bois, a été mis en évidence par Poussard au début du 20ème siècle [113,282,288].

Une méthode de taille très connue dans le monde viticole est d'ailleurs associée au nom de cette personne. Le principe de la taille dite 'Poussard' est d'éviter toute déconnection des

flux de sève en ne taillant que la partie supérieure de chaque tronc ou bras tout en préservant la symétrie du cep. Pour garantir une taille harmonieuse au niveau des deux bras du cep, seule les pousses situées à l'extrémité de chaque bras sont gardées. Le fait de concentrer la totalité des plaies de taille dans la partie supérieure des bras favorise le développement du cep sur un plan horizontal et permet de limiter le risque d'interruption des trajets de sève. En conséquence, les blessures annuelles causées par les tailles hivernales seront également concentrées sur la partie supérieure des bras. Actuellement, suivant ce principe, deux méthodes de taille sont utilisées : une Guyot-Poussard « mixte » (deux coursons et une longue baguette) et un « double » Guyot-Poussard (deux coursons et deux longues baguettes) [286].

Le lien entre la taille Guyot-Poussard et la lutte contre les maladies du bois est complexe et, parfois, une certaine confusion a pu être faite sur ce point. En effet, lorsqu'au début du 20ème siècle, Lafon a décrit pour la première fois l'impact du mode de taille sur le dépérissement de la vigne, le système de notation ne prenait pas en compte les symptômes foliaires caractéristiques de l'Esca. Ce n'est que plus tard que Marsais (1923) et Viala (1926) ont inclus ces symptômes foliaires dans la description de l'Esca. Par ailleurs, les études menées par Lafon ne discriminaient pas l'Esca, de l'eutypiose dont les symptômes n'ont été décrits en France, qu'à la fin des années 70 [289,290]. En raison du manque de connaissance des symptômes caractéristiques de l'Esca, les différences observées par Lafon (1921) sur l'effet de différents modes de taille sur des vignes symptomatiques et apoplectiques pourraient concerner d'autres maladies que l'Esca [291,292]. Très récemment Lecomte *et al.* (2018) [8], ont apporté une contribution significative sur l'effet de différentes tailles, dont celle inspirée de Guyot-Poussard, sur le développement des MDB. Après 10 ans d'essais leurs conclusions ont été les suivantes: i) le mode de conduite et les modalités de taille influencent grandement le taux de sévérité de l'Esca ; ii) l'augmentation de la longueur des cordons pourrait permettre de limiter l'impact des nécroses sur la vascularisation du cep ; iii) la simplification des modes de conduites, en particulier en ce qui concerne les pratique de taille (mécanisation) ont pu favoriser le développement de l'Esca au vignoble.

V.2.2. Taille précoce vs. Taille tardive

Les plaies de taille constituent une voie d'entrée privilégiée pour les agents pathogènes impliqués dans les maladies du bois de la vigne [38,293,294]. Les blessures les plus récentes seraient les plus vulnérables à l'action des pathogènes [93,139,294–296]. Afin de minimiser tout risque d'infection, les vignes devraient être taillées au moment où l'inoculum est le moins répandu et la cicatrisation des plaies de taille est la plus rapide [49]. La période de libération des spores varie en fonction du type de champignon pathogène impliqué, et de la situation géographique de la parcelle. En conséquence, le risque d'infection des plaies de taille dépend principalement des conditions climatiques, propres à chaque région viticole [49]. Qu'elle soit tardive [65,206], ou précoce [296], la taille est un élément clé de la lutte contre l'Esca. Des recherches plus approfondies sont nécessaires pour ajuster correctement la période de taille en fonction de chaque région viticole et pour chacun des agents pathogènes impliqué.

V.2.3. La taille en deux temps

Le principe de la taille en deux temps est le suivant : (i) une première phase de taille mécanique est effectuée en hiver lorsque les sarments sont sectionnés 30 à 45 cm au-dessus de leur point d'insertion sur le bras. (ii) Une taille manuelle est ensuite effectuée au printemps, avant le débourrement. Cette méthode permet de limiter le risque d'infection des plaies de taille par les agents pathogènes de l'Esca, puisque les tissus infectés au moment de la taille hivernale sont éliminés à la suite d'un nouvel épisode de taille au printemps. Ce mode de conduite, offre au viticulteur la possibilité de déclencher la seconde phase de taille au moment où le risque d'infection par les agents pathogènes est faible.

Bien que certains agents pathogènes impliqués dans l'Esca restent actifs dans le bois mort jusqu'à 48 mois [296], l'élimination des bois de taille permet de réduire la charge d'inoculum. Néanmoins ce type d'itinéraire cultural n'est applicable que dans les vignobles pratiquant une taille courte ou en cordon. En effet, dans le cas d'une taille longue, il est nécessaire de préserver une baguette âgée d'un an, pour assurer la future production de fruits [297]. En raison du coût économique important occasionné par les deux opérations de taille successives, cette approche reste peu utilisée par les viticulteurs comme moyen de prévention contre l'Esca [4,286].

V.2.4. La taille mécanique et taille rase de précision (TRP)

La mécanisation de la taille est partielle, car aujourd'hui, aucun système ne permet de reproduire à la fois le mouvement du bras du tailleur et sa réflexion dans le choix d'un courson, ou d'une baguette. Les opérations mécanisées sont la pré-taille, la taille rase et le tirage des sarments. La taille mécanique, permet une réduction significative du temps de travail et une diminution des coûts de productions. Cependant, ce mode de conduite est incompatible avec les cahiers des charges des AOP, qui limitent le nombre 'd'yeux' sur chaque cep. Ainsi, le recours à la taille mécanique concerne principalement les vignobles IGP et Vins de France. En effet, dans le cas des systèmes de taille mécanisés, le nombre de bourgeons est sensiblement plus élevé qu'avec une taille manuelle traditionnelle. Or, c'est au travers de ce nombre de bourgeons que s'exprime le potentiel agronomique de la vigne.

La taille mécanique « en haie », est un mode de conduite qui repose sur la réalisation d'un pré-taillage plus ou moins ras, réalisé par une « pré-tailleuse », sur un cordon libre, placé en hauteur. Très répandue en Australie, ce système de taille mécanisé est peu qualitatif, et ne convient qu'à des vignes de vigueur moyenne en raison de la forte charge en bourgeons qu'il génère. La taille rase de précision (TRP), est une taille mécanique souvent suivie d'une reprise manuelle afin de réduire le nombre de coursons laissés et d'éviter les entassements. Alors que la taille mécanique « en haie » ne peut être pratiquée que sur des cordons libres, la TRP peut être effectuée en présence de cordons montés sur espalier ou associés à un système de releveurs. Les essais terrains menés par le Bureau National Interprofessionnel du Cognac (BNIC) rapportent que la taille mécanique ou « taille en haie » engendrerait moins de symptômes d'Esca, et de formes apoplectiques que les tailles longues classique i.e. les tailles pour lesquelles quatre à dix yeux sont conservés par sarment. En effet, dans le cas d'une taille en haie, tailler uniquement le bois de l'année et laisser une grande quantité 'd'yeux' (50 à 80), provoque de nombreux départs de rameaux et n'engendre que de petites plaies de taille, généralement situées loin du tronc. Ce mode de conduite, inspiré notamment des travaux du professeur Cesare Intrieri de l'Université de Bologne (1983) [298], pourrait avoir un effet bénéfique pour limiter l'impact des maladies du bois, mais des études scientifiques approfondies sont nécessaire pour valider ces observations.

V.2.5. La taille minimale ou non-taille

Afin de minimiser les opérations de taille pour limiter les risques d'infection par les agents pathogènes des MDB, certains viticulteurs pratiquent la taille minimale ou « non-taille ». Ce mode de taille consiste à laisser un cordon se développer librement dès sa formation. Les opérations relatives à l'ébourgeonnage, la taille des sarments ou la pré-taille ne sont pas effectuées. Les sarments se développent aussi librement, sans aucun écimage, à l'exception des opérations de rognages permettant de limiter le développement de la canopée et la charge de raisins. Les années qui suivent la formation du cordon, une surproduction importante de fruits pénalise la maturation du raisin. Cependant, au bout de 2 à 4 ans, dans les situations de vigueur modérée, la vigne va s'autoréguler. On observe alors qu'une partie seulement des bourgeons débourre, la croissance des sarments est fortement ralentie et la fertilité diminue. Lorsque cet équilibre est atteint, le raisin va mûrir normalement par comparaison à une taille courte classique. Toutefois, en zone tempérée, la non-taille peut occasionner des difficultés et des délais de maturation, accompagnés d'attaques de Botrytis, en particulier lorsque la charge de raisin n'est pas régulée.

Par rapport aux MDB, cette pratique permet de réduire les risques de dépérissement à Eutypa [299] et s'avérerait efficace dans la lutte contre l'Esca. En effet, Travadon *et al.* (2016) [121], ont montré que la taille minimale était associée à une plus faible incidence de ceps symptomatiques de l'Esca. Ces auteurs ont également rapporté qu'en comparaison avec un système de taille courte classique, une plus faible proportion de nécroses dans le bois, et une diversité réduite de champignons pathogènes, ont été observées dans le tronc des ceps sur lesquels la taille minimale est pratiquée. Des résultats similaires ont été décrits en France par Lecomte *et al.* (2012) [113]. Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle, un système de taille favorisant les plaies d'élagage, pourrait stimuler la formation de nécroses interne, et ainsi exposer le système vasculaire des ceps à un risque accru d'infection par des champignons pathogènes.

D'un point de vue économique, ce mode de conduite offre également aux viticulteurs, la possibilité de réduire fortement les dépenses annuelles nécessaires au financement des opérations de taille.

V.3. Méthodes de protection des plaies de taille

La vigne est une plante ligneuse qui répond aux blessures de diverses façons [300], pour laquelle la protection des plaies de taille est un élément clé dans la réduction du risque d’infection. Plusieurs fongicides se sont avérés efficaces dans la protection des plaies de taille [286,301]. Néanmoins, leur période d’action réduite par rapport au temps de cicatrisation, laisse une fenêtre d’infection de 4 à 16 semaines en fonction de la période de taille [93,294]. De nouvelles formulations ont été proposées et sont en cours de développement [302]. A l’heure actuelle, certains produits, homologués dans plusieurs pays Européens, sont appliqués quotidiennement par les viticulteurs [286]. La composante essentielle de tout produit visant à protéger efficacement les plaies de taille, qu’il soit d’origine chimique ou physique, est d’agir sur le long terme.

V.3.1. Protection chimique

Plusieurs essais de protection chimique des plaies de taille ont été menés au vignoble, via l’utilisation de préparations commerciales à base de carbendazime (famille des benzimidazoles) comme l’Atemicep[®] (association de cyproconazole et de carbendazime) et l’Escudo[®] (association de flusilazole et de carbendazime) ; ou à base de bénomyl (famille des carbamates) [4,42,303,304]. Cependant, le carbendazime a été interdit à la vente en 2009 en raison de sa forte toxicité pour l’Homme et l’environnement, et le bénomyl a également été interdit d’utilisation pour les préparations de pesticides bénéficiant d’une autorisation de mise sur le marché [293].

V.3.2. Agents de biocontrôle

Certains agents de bio-contrôle permettent de limiter la colonisation des champignons pathogènes au niveau des plaies de taille. *Fusarium lateritium*, *Chaetomium* spp. et *Trichoderma* spp. ont été testés contre les maladies du bois de la vigne [37]. Malgré l’action

retardée des biofongicides en comparaison aux moyens de lutte chimiques, les conditions optimales de croissance permettant de garantir l'efficacité de ces agents de biocontrôles sont les mêmes que pour les agents pathogènes impliqués dans le dépérissement des ceps [301].

Les *Trichoderma* sont des champignons ascomycètes présents dans le sol et présentant un effet antagoniste ainsi que des propriétés d'hyperparasitisme, face à divers agents pathogènes [305–307]. Lorsqu'ils prolifèrent dans le sol, ces champignons ont un effet bénéfique sur la croissance des plantes, et peuvent jouer le rôle d'éliciteurs, induisant des mécanismes de résistance de la plante hôte [308,309]. *Trichoderma atroviride* (souche SC1 et USPP-T1) et *T.harzianum* se sont avérés efficaces dans la protection des plaies de taille [310–312]. En France, des résultats encourageants ont également été rapportés via l'utilisation de la souche I-1237 de *T. atroviride* (Esquive®) contre la formation des chancres et nécroses causés par les plaies de tailles [313,314]. En effet, Mounier *et al.* (2014) [315], ont montré que l'application d'Esquive® pendant deux ans sur les plaies de tailles, permettait de réduire les symptômes foliaires de l'Esca de 50% et de diminuer le taux de mortalité des ceps. Toutefois, une réelle efficacité au champ n'a pas pu être démontrée. En Italie, *T. asperellum* et *T. gamsii* (Remedier®) ont permis d'obtenir des résultats similaires à l'application d'Esquive® [316,317] tandis qu'au Portugal, la souche I-1237 de *T. atroviride* s'est avérée efficace contre la prolifération de Pch et de *N.parvum* [318].

D'autres agents biologiques ont été étudiés dans le cadre de la lutte contre l'Esca, comme le chitosane et la cystéine. Le chitosane est une molécule élicitrice non toxique, capable de limiter le développement et l'incidence des symptômes causés par Pch en serre, et d'*E. lata* et Fm en conditions *in vitro* [319]. La cystéine semble également présenter des propriétés fongicides contre les agents pathogènes de l'Esca [316]. Ces molécules naturelles, doivent encore être testées en condition réelle pour valider leur efficacité avant d'être utilisés dans des produits commercialisables.

V.4. Stratégies de gestion des vignobles infectés

Une des pratiques les plus répandues à l’heure actuelle pour préserver la longévité des ceps atteints par les maladies du bois, consiste à effectuer des opérations de réparations chirurgicales. Il s’agit, au moyen de divers outils, d’éliminer de la plante toutes les zones infectées, pour ne laisser que du bois sain. La vigne est caractérisée par un système racinaire profond lui permettant de renouveler rapidement les parties éliminées et de récupérer en quelques années, un niveau de production similaire à celui d’une plante saine, aussi bien en termes de quantité que de qualité. Cette stratégie, longue et coûteuse à mettre en place, est adaptée à la préservation de variété de clones ou pour prolonger la vie de ceps infectés, dans les vignobles à forte rentabilité économique [284–286]. En fonction du mode de conduite appliqué et de la sévérité de la maladie, l’élimination des tissus infectés peut ne concerner qu’une partie du cep (bras, sarments, chicot). L’efficacité de cette approche, confirmée par des études scientifiques dans le cas d’Eutypiose [284,321,322], pourrait également fonctionner contre les dépérissements à *Botryosphaeria* ou à l’Esca, à condition que la totalité des tissus infectés soient retirés [322].

V.4.1. Reçepage ou TTR (Timely Trunk Renewal)

Dans le cas des maladies du bois de la vigne, la majorité des tissus infectés est concentrée dans les parties internes des bras et du tronc [112]. Plusieurs approches existent en fonction du type de dépérissement, du niveau d’infection et de la présence d’un porte-greffe. La plus simple à mettre en place consiste à couper le tronc pour éliminer les parties infectées, puis à sélectionner un pampre sain qui deviendra le prochain tronc [206,322]. Le renouvellement des tissus contaminés passe ainsi par le remplacement du tronc infecté par un autre, sain. Afin d’éviter tout risque de contamination, il est recommandé de laisser une marge de tissus sain de 10 cm pour *Botryosphaeria*, et de 20 cm pour *E. lata*, avant d’effectuer la coupe du tronc [80,323,324]. Certains cépages ne sont pas adaptés au reçepage en raison d’une production insuffisante de pampres [325]. Bien que la stratégie privilégiée par les viticulteurs reste l’arrachage des plants, le reçepage est une manière rentable de maintenir le niveau économique d’un vignoble infecté, tout en préservant l’homogénéité de

la récolte [286]. Le taux de succès du recépage dans les vignes infectés par l'Esca dépend du niveau de sévérité de la maladie. Les agents pathogènes de l'Esca peuvent coloniser le système racinaire du pied infecté, rendant caduque l'élimination des nécroses dans les parties supérieures [42,231]. Néanmoins, il semblerait que les racines soient moins impactées par l'Esca que le reste de la plante [286,326].

V.4.2. Curetage

Une autre méthode de réparation chirurgicale, appelée curetage, consiste à éliminer toute présence d'amadou dans le tronc des ceps, au moyen d'une élagueuse ou d'une scie à main électrique. Cette technique a été utilisée exclusivement contre l'Esca. La pratique du curetage est actuellement remise au goût du jour par de nombreux praticiens pour limiter le développement des symptômes liés aux maladies du bois, en particulier en France dans le Bordelais et le Sancerrois. Cholet *et al.* (2019) [327], ont récemment conduit une expérimentation pendant 4 années et ont montré que le curetage permet de réduire efficacement l'érosion parcellaire due à l'Esca en limitant fortement la réapparition des symptômes foliaires de cette maladie, ceci sans modification fondamentale du fonctionnement physiologique des ceps, ni du rendement et de la qualité des baies en termes de maturation technologique. Pratiquer cette technique sur des plants présentant des symptômes d'Esca permettrait de réduire leur taux de mortalité, et de continuer à produire avec un niveau quantitatif et qualitatif non dégradé. On peut cependant mentionner que les résultats sont intéressants avec les ceps ne présentant pas des symptômes trop prononcés d'Esca, les ceps apoplectiques ne sont pas, par exemple, traités avec cette technique.

Dans le monde viticole, il a aussi été évoqué depuis des temps lointains, sans que cela ait été démontré, que d'autres facteurs, impliquant l'exposition des parties curetées à l'air libre, pourraient intervenir. Ainsi, le maintien d'un contact prolongé entre les tissus infectés et l'oxygène de l'air est à la base d'une pratique ancienne, toujours utilisée par certains viticulteurs pour lutter contre l'Esca [38]. Elle consiste à placer une pierre au centre d'un tronc, coupé dans le sens de la longueur. L'absence de démonstration rend cependant cette pratique très aléatoire dans sa conception et la qualité de ses résultats.

V.4.3. Regreffage

Lorsque les dégradations causées par les agents pathogènes de l’Esca sont trop près du point de greffage, il est possible d’effectuer une opération de regreffage pour obtenir de nouveaux pampres sains. Cette méthode de lutte principalement utilisée en France a été développée par le Service Interprofessionnel de Conseil Agronomique, de Vinification et d’Analyses du Centre (SICAVAC) [328]. L’objectif du regreffage est de prolonger le niveau de production de ceps infectés. En pratique, cette technique également appelée « greffe en fente » consiste à fendre chaque porte-greffe au moyen d’une lame avant d’insérer, à chaque extrémité de la fente, un greffon, taillé en forme de V. Comme pour le recepage, des observations empiriques rapportées par la profession, indiquent que les plants traités récupèrent en l’espace de 2-3 ans un niveau de production similaire à celui d’un cep sain. Le regreffage semble également fonctionner pour les plants présentant un taux élevé de nécroses internes à condition que le bois d’aubier ne soit pas affecté [286,329]. Ce point est essentiel car des expérimentations scientifiques menées en Italie et en France, ont montré que les symptômes de dépérissement réapparaissaient après regreffage sur les plants dont le porte-greffe présentait des signes de contamination [231,286]. Des recherches plus approfondies sont nécessaires pour confirmer l’efficacité du regreffage sur les plants atteints par l’Esca.

V.4.4. Complantation

Face à la difficulté d’éradiquer l’Esca, le recours à la complantation est aujourd’hui fréquent chez les viticulteurs [286]. Cette méthode consiste à arracher les ceps malades et à les remplacer par de nouveaux plants. Ceci est nécessaire car, lorsque les ceps apoplectiques ne sont pas remplacés, ils peuvent constituer des réservoirs d’inoculum en champignons pathogènes de l’Esca pour les autres ceps. Il est donc primordial de les éliminer pour éviter la prolifération des agents pathogènes et limiter les contaminations entre ceps. Par contre, suite au remplacement des ceps malades, de jeunes pousses et de vieilles vignes vont cohabiter au sein d’une même parcelle. Une compétition pour l’acquisition de ressources pourra alors exister entre les anciens pieds et les nouveaux ceps implantés.

V.4.5. Taille des rameaux symptomatiques

Couramment utilisé en Allemagne, en Italie, et en Hongrie, cette pratique se développe en Espagne et en France [286]. Le principe consiste à éliminer les rameaux infectés dès l'apparition de symptômes de dépérissement au cours de la saison végétative. Bien que certains viticulteurs aient observé une résilience des symptômes sur les plants traités, aucune expérimentation scientifique n'a pu confirmer l'intérêt de cette pratique. Par ailleurs, dans le cas de l'Esca, l'irrégularité d'apparition des symptômes foliaires d'une saison sur l'autre [330] ne permet pas d'évaluer l'efficacité de cette méthode.

V.5. Méthodes innovantes de traitement post-infection

Les méthodes présentées ci-dessous ont fait l'objet d'essais terrains menés par la profession viticole. Certaines expérimentations n'incluent pas de témoins non-traités et ne peuvent donc être validées par la communauté scientifique. En Europe, l'Esca représente la maladie de dépérissement la plus répandue. L'unique moyen de diagnostic disponible à l'heure actuelle, consiste à noter la présence de symptômes foliaires caractéristiques, qui peuvent ne pas réapparaître d'une saison sur l'autre. A ce titre, la validation scientifique des résultats obtenus au champ nécessite plusieurs années d'expérimentations consécutives. Un historique détaillé de l'état sanitaire des ceps de la parcelle d'étude, constitue également un élément clé, car il permet de sélectionner des individus représentatifs. L'intérêt majeur de ce type d'expérimentation est de renseigner la communauté scientifique sur les contraintes d'application pratiques des différentes solutions de contrôles testées par la profession.

V.5.1. Injections de peroxyde d'hydrogène dans le tronc des ceps

L'injection de solutions de traitement dans le tronc des ceps, permet d'envoyer les principes actifs au contact des agents pathogènes vasculaires via les vaisseaux conducteurs de sève. Cette technique a été testée sur des plants infectés par MDB en Italie et en France via l'utilisation de triazoles, de fosetyl-Al et d'acide 2-hydroxybenzoïc [231,331,332].

D'autres expérimentations menées en France, en Espagne et au Portugal, ont mis en pratique l'injection de 3 à 4 ml de peroxyde d'hydrogène dans le tronc de ceps infectés. De bons résultats ont été rapportés par la profession, bien qu'aucune expérimentation scientifique n'ait permis de confirmer l'efficacité de ce traitement. Plusieurs études menées en pépinière et *in vitro* n'ont révélé aucun effet direct du peroxyde d'hydrogène sur les agents pathogènes impliqués dans les maladies du bois de la vigne [286,321,333].

V.5.2. Insertion de fongicides dans le tronc des ceps

Différentes molécules antifongiques ont été testées *in vitro* et au vignoble telles que l'acide salicylique, associées à des fongicides systémiques capables d'emprunter les trajets de sève [334]. Parmi elles, le prothioconazole, le tebuconazole, le fluozinam et le thiphanate s'avèrent particulièrement efficaces contre Pch, Pmin et contre les *Botryosphaeriaceae* [42,293]. Néanmoins, certains auteurs, ont montré que l'injection de fongicides dans le tronc permettait de réduire la fréquence d'apparition des symptômes foliaires sur le court terme, mais n'avait aucun effet sur les nécroses internes du bois [331,332,335].

V.5.3. Insertion d'inocula de *Trichoderma* spp. dans le tronc des ceps

En Espagne, pour lutter contre les symptômes d'Esca, une méthode utilisant des tiges en bois préalablement inoculées par *Trichoderma* spp. puis insérées dans le tronc de ceps infectés par l'Esca, a été testée [286]. Au printemps, une surface d'environ 2-3 cm² d'écorce est retirée du tronc des ceps infectés, puis est perforée pour y insérer les tiges inoculées par *Trichoderma* spp. En pratique, trois inoculations sont réalisées, une à la base du tronc et deux au niveau des bras. L'efficacité de cette technique repose à la fois sur l'effet antagoniste de *Trichoderma* spp. sur les agents pathogènes, ainsi que sur sa capacité à induire une réponse de défense du cep [336–338]. Néanmoins aucune réduction significative de l'incidence de l'Esca ou de l'apparition de symptômes foliaires n'a été mise en évidence chez les ceps traités.

V.5.4. Insertion de clous en cuivre dans le tronc des ceps

Afin de limiter le développement des nécroses dans le bois de ceps infectés, une méthode, basée sur l’insertion de clous en cuivre au niveau du tronc a été testée dans des vignobles de la région de Galice (Espagne) [286]. Les décolorations autour de la zone d’insertion, observées par les viticulteurs suggèrent une diffusion lente et constante de cuivre dans la plante. Les propriétés antifongiques et bactéricides du cuivre permettraient de limiter la formation d’amadou au niveau des zones d’insertion mais l’efficacité de cette méthode n’a pas encore été validée par la communauté scientifique. En complément, des expérimentations seront nécessaires pour identifier: le nombre de clous requis ; leurs positions optimales sur le cep ; ainsi que les risques potentiels de toxicité pour le plant traité et son environnement.

V.5.5. Endothérapie végétale

Une méthode innovante d’endothérapie, potentiellement curative, est actuellement en cours de développement, et fait partie d’un brevet international pour l’utilisation du sous-salicylate de bismuth et ses dérivés comme agents phytopharmaceutiques [339]. Ce composé, utilisé à la base dans la médecine humaine, est capable d’inhiber de manière significative la croissance de différents agents pathogènes dont *N. parvum* mais permet également de limiter significativement la formation et l’expansion des nécroses dans des échantillons de bois artificiellement inoculés par *N. parvum*.

L’endothérapie végétale, autorisée en France depuis 2014, est régulièrement utilisée en culture fruitière dans la lutte contre les agents pathogènes du pommier et de l’avocatier [340,341] mais aussi en zones urbaines [342] car elle présente de nombreux avantages sur le plan environnemental. En effet, par comparaison à une pulvérisation classique, cette technique permet une réduction des doses de traitement et limite la dérive des produits dans le sol, l’air et l’eau, réduisant ainsi l’impact sur les organismes non ciblés [343].

Sur la vigne l’endothérapie consiste à percer un trou verticalement dans le tronc des ceps infectés afin d’atteindre et de traiter directement l’amadou en y injectant des molécules fongicides tel que le salicylate de bismuth [344]. Cette méthode, comparable à un « curetage chimique » permettrait de cibler les zones de prolifération des champignons pathogènes responsables de la formation de nécroses tels que Fm. Des premiers tests en vignobles, réalisés en 2018 ont montré une tendance assez prometteuse puisque les conditions d’expérimentation ont conduit à une réduction de l’expression des symptômes foliaires pouvant aller jusqu’à 50% sur certains cépages et pieds traités en comparaison avec des témoins. Ces tests seront renouvelés et suivis sur le long terme afin de confirmer ces résultats préliminaires [343].

V.6. Méthodes de contrôles de l’Esca en pépinières

Depuis l’invasion du phylloxera, suivi de la généralisation du greffage sur une variété résistante, les pieds de vigne sont le résultat de l’assemblage entre un porte-greffe et un greffon. Ces plants greffés soudés sont produits par les pépiniéristes qui assurent leur multiplication et leur commercialisation selon des normes très strictes. Au cours du processus de production, en raison du grand nombre de blessures infligées au cours des différentes étapes, le matériel de plantation est particulièrement sensible aux infections par les agents pathogènes [42,49]. Une enquête internationale a été menée en 2015 par David Gramaje et Stefano Di Marco dans les pépinières de 13 pays Européens. L’objectif était d’identifier les principaux risques d’infection lors de la préparation des plants et de proposer des pistes de recherche pour améliorer les moyens de lutte contre les maladies du bois dès la production en pépinière. L’enquête s’est concentrée sur les pratiques culturelles et sanitaires employées au niveau des vignes mères de porte-greffes, lors de la récolte, du transport des boutures du champ jusqu’à la pépinière et lors des opérations de greffage [345].

En effet, lorsque de jeunes vignobles sont contaminés, la source de l’infection provient, soit des plants mères [42,100,102], soit du processus de propagation (infection au niveau des blessures ou des points de greffage) [42,98,105]. Un programme de gestion intégré incluant des stratégies de contrôle physique, chimique, et biologique a été suggéré comme étant la

procédure la plus efficace pour réduire les infections par des agents pathogènes fongiques du tronc en pépinière [346]. L'utilisation simultanée de pratiques culturales limitant le nombre de blessures sur les plants, d'étapes d'assainissement par trempage à l'eau chaude, de traitement chimique ou biologique des boutures, permettent de limiter les risques d'infection [42,49].

Différentes techniques sont utilisées en pépinière afin de répondre à ces normes sanitaires. Le matériel de propagation peut être traité par des bains de captane, de bénomyl, de carbendazime ou de didecylméthylammonium chloride, afin de réduire la présence de Pch et de *Phaeocramenium* spp. sur le matériel végétal [90,147,333,347]. En complément, l'association de cyprodinil et de fludioxinil, ou de pyradostrobine et de metiram, entraîne la diminution de *Cylindrocarpon* spp., de Pch et de *Botryosphaeriaceae* [348].

Plusieurs expérimentations ont permis de tester l'efficacité de *Trichoderma* spp. pour le contrôle des infections par les agents pathogènes des MDB en pépinière [49]. Les premiers résultats ont montré un effet positif de l'application de *Trichoderma* spp. sur les plants en pépinières avec une augmentation du recouvrement par le callus et une croissance racinaire accrue [349]. De futures recherches permettront d'optimiser l'incorporation de l'étape de traitement par *Trichoderma* spp. dans le processus de préparation du matériel de plantation. L'objectif sera d'optimiser le taux de colonisation des souches de *Trichoderma* spp. pour amplifier son action préventive contre le développement des agents pathogènes, tout en étudiant les possibles effets antagonistes avec les autres étapes de préparation des plants.

Des recherches sur les méthodes de lutte sont menées également au niveau de la production des plants en pépinières car les champignons pionniers de l'Esca se propagent par le matériel végétal [42,345]. Parmi les traitements effectués sur le matériel de propagation, le traitement à l'eau chaude permet de réduire les sources d'inoculum [122,350]. Un traitement de 30 min à 50°C permet de réduire l'incidence de Pch jusqu'à 78% [98,347,351]. De plus, Elena *et al.* (2015) [352], ont montré qu'une température de 51-53°C pendant 30 min permettait de limiter le développement de huit espèces de *Botryosphaeriaceae*.

VI. Objectifs de thèse

Comme énoncé précédemment concernant les moyens de protection de la vigne contre les MDB, la variété des sources d'inoculum d'agents fongiques pathogènes, et le développement très lent et non visible des champignons dans le bois, rendent très difficiles la mise en œuvre des méthodes de lutte. Aucune méthode ne permet à ce jour d'arrêter efficacement et durablement le développement de ces pathologies, ce qui constitue un verrou scientifique et technologique majeur dans la lutte contre les MDB.

Ces dernières années, en France et à l'étranger, les contributions scientifiques relatives à l'étude des MDB ont été très nombreuses et ont abordé des thèmes très divers. Par exemple, on peut mentionner celles portant sur l'épidémiologie, la mise au point d'outils de diagnostic, l'étude des champignons pathogènes et leurs cycles de vie, la production de pathotoxines, les relations que les agents fongiques établissent avec la plante, la recherche de marqueurs de tolérance chez la vigne, les pratiques culturales (e.g. taille, greffage), le biocontrôle et l'analyse du microbiote colonisant le bois de ceps atteints, ou non, d'esca.

Cependant en dépit de cette très grande diversité des approches, très peu d'études ont été consacrées au fonctionnement physiologique des ceps, en particulier au dysfonctionnement du système vasculaire des ceps censé être observé chez les vignes symptomatiques à l'Esca. Les conséquences que cela induirait sur l'acquisition des ressources en eau et carbone chez la vigne n'ont, à notre connaissance, pas ou peu été abordées.

Il est important de rappeler que cette étude trouve son origine dans le fait que ce dysfonctionnement vasculaire est très souvent avancé, et ceci depuis des dizaines d'années [282] pour décrire le dépérissement des ceps, mais étonnamment, il n'a pas été scientifiquement démontré.

Dans ce contexte, il nous est apparu pertinent d'appréhender le dépérissement dû à l'Esca en ciblant cette thèse sur la réponse physiologique de la vigne à cette maladie du bois. Dans le cadre de nos travaux, seront étudiés :

- (i) ***L'expression de l'esca au cours du temps (i.e. durant plusieurs années)*** : son impact sur plusieurs paramètres physiologiques des ceps dont la transpiration foliaire, la conductance stomatique, la circulation des flux de sève dans la plante, l'expression de gènes foliaires, etc, seront étudiés. L'expression des symptômes foliaires et le taux de nécroses seront aussi appréhendés.

Cette partie est décrite au **chapitre 2** : « Suivi de la réponse écophysologique de ceps infectés par l'Esca et étude des mécanismes impliqués ».

- (ii) ***Comparaison de deux modes de taille sur la physiologie des ceps et l'esca*** : l'influence de cette pratique culturale est fréquemment, pour ne pas dire toujours, associée à l'Esca. Dans la présente étude, une taille dite 'conventionnelle' sera comparée à une taille dite 'respectueuse des trajets de sève'.

Cette partie est décrite au **chapitre 3** intitulé : « Comparaison de deux modes de taille sur la physiologie des ceps. Liens avec l'expression de l'Esca ».

La fondation sur laquelle repose le choix des deux facteurs choisis : (i) l'expression de l'Esca au cours du temps moyen à long pour une maladie, i.e. plusieurs années, et (ii) la taille des ceps, repose soit, sur des expérimentations antérieures qui ont montré qu'ils étaient spécifiquement associés à l'Esca (facteur i), soit à partir d'observations au vignoble et de fortes présomption quant à son implication dans cette maladie (facteur ii).

- (i) L'expression de l'Esca au cours du temps : la dégradation de l'état de santé de la plante touchée par l'Esca est en corrélation avec la formation de nécroses dans la bois par les champignons pathogènes [353], l'extension de ce processus aux vaisseaux conduirait au dysfonctionnement du système circulatoire du cep. Ce processus est long et dure pendant plusieurs années, sans qu'on sache précisément quelle est sa durée. Cependant, l'association nécrose/dysfonctionnement vasculaire, qui est somme toute logique, doit être consolidée au niveau des résultats pour être acceptée sans ambiguïté. Par exemple, existe-t-il un type de nécrose vraiment spécifique de l'Esca ? L'amadou semble un bon candidat [126,353], mais il est nécessaire

aujourd'hui d'acquérir d'autres résultats sur ce point afin de vérifier cette assertion.

Par ailleurs, plusieurs interrogations au niveau physiologique existent, e.g. sur les flux de sève, la conductance stomatique, ou la transpiration. Les flux de sève ou la conductance stomatique sont-ils impactés avant l'expression des symptômes foliaires ? Si c'est le cas, combien de temps avant leur apparition ? Quel est également l'impact après l'expression des symptômes foliaires ? Ces paramètres changent-ils d'une année à l'autre ? Une plante symptomatique à l'Esca l'année n est-elle autant, ou plus impactée, l'année n+1 ? Une plante symptomatique l'année n et asymptomatique l'année n+1 est-elle affectée de la même manière au niveau de ces paramètres ? Des réponses à ces différentes interrogations seront recherchées dans cette partie.

- (ii) la taille des ceps : c'est la pratique culturale, la plus connue et utilisée. Elle est censée influencer la vigueur des ceps et leur vulnérabilité à l'Esca [121,139]. De la pépinière jusqu'à la production en passant par la plantation, chaque intervention culturale (greffage, taille) influe sur plusieurs facteurs clés de la plante: évolution du microbiote, développement des agents pathogènes, formation de nécroses et dysfonctionnement des vaisseaux. Cette séquence d'événements est primordiale car l'importance du volume de bois fonctionnel nécrosé semble conditionner la probabilité d'apparition des symptômes foliaires et le dépérissement des ceps [8,353]. Il est donc capital de prévenir, limiter ou réduire le développement des nécroses d'Esca au cours de la vie d'un cep et l'influence de la taille sera abordée dans notre étude.

Plusieurs paramètres étudiés dans la partie (i) seront aussi mesurés dans la (ii) mais en comparant deux méthodes de taille. Dans le cadre du projet GTDfree (voir page 153), la formation des cônes de dessiccation sera aussi observée par C. Cholet (UR œnologie, ISVV) et les premiers résultats seront commentés dans ce manuscrit, car ils sont complémentaires des nôtres pour différencier les qualités de tailles et leurs effets sur les ceps. Une hypothèse est que ces cônes seraient, en effet, les précurseurs des nécroses dans le bois. L'objectif en commençant l'étude (ii) très tôt, c'est-à-dire dès que ces deux tailles seront appliquées, sera de voir à quel moment les premiers paramètres sélectionnés que nous suivrons commencent à se différencier en fonction du traitement appliqué aux ceps.

A l'issue de ces deux parties, l'ensemble des résultats sera discuté de manière globale et replacés dans le cadre général des connaissances sur les MDB. Des perspectives suite à ces travaux de thèse seront présentées dans le **Chapitre 4** « Discussion générale et perspectives ».

Chapitre 2 - Suivi de la réponse écophysiological de ceps infectés par l’Esca et étude des mécanismes impliqués

Avant-propos 2

L’Esca est une pathologie complexe, influencée par plusieurs facteurs biotiques et abiotiques, qui nécessite d’être étudiée par une approche intégrée. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons cherché à réaliser un diagnostic physiologique des ceps en comparant des plants symptomatiques et asymptomatiques à l’échelle du cep entier, i.e. tronc, bras et feuilles. L’hypothèse d’un dysfonctionnement vasculaire, imputé à l’Esca, à l’origine du dépérissement des ceps infectés par la maladie est le point central de notre étude.

Dans une première parcelle, nous avons utilisé et placé des capteurs de flux de sève, adaptés de Granier [354], sur le tronc de vignes du cépage Cabernet Sauvignon âgées de 16 ans. Nous avons suivi plusieurs indicateurs physiologiques, comme la conductance stomatique ou la transpiration foliaire, afin d’étudier l’Esca au vignoble indépendamment de l’expression des symptômes foliaires caractéristiques de la maladie, i.e. avant et après leur expression. Grâce à ces capteurs, les travaux ont permis d’établir, que les flux de sève des ceps symptomatiques étaient significativement plus faibles ainsi que la transpiration foliaire (environ 30%), une semaine avant l’apparition des premiers symptômes foliaires. Les analyses d’images ont également révélé une plus large proportion de nécroses, particulièrement d’amadou (supérieur à 10%), dans le bois des ceps symptomatiques. Afin de consolider ces résultats, nous avons sélectionné une seconde parcelle (17 ans d’âge au début de l’expérimentation), dans le même vignoble, dont le suivi de l’historique sur les symptômes foliaires d’Esca avait été fait, cep par cep, pour les symptômes d’Esca depuis la plantation. Cet historique réalisé sur le temps long terme a permis de sélectionner un échantillon représentatif de ceps sains (témoins) et de ceps symptomatiques à l’Esca. Nous

avons également utilisé des capteurs non-invasifs, spécifiquement conçus pour la vigne, et placés cette fois sur les bras des ceps. Pendant deux saisons consécutives, ces capteurs ont été installés au plus près des plaies de taille, sur les rameaux de l'année n-2 de ceps sains, et de ceps symptomatiques les années précédentes. Cette localisation nous semble particulièrement intéressante car elle est proche des feuilles où les symptômes d'Esca apparaissent.

Nous avons ainsi pu montrer que la transpiration des ceps infectés, et les flux de sève, étaient significativement plus faibles plusieurs semaines avant que les premiers symptômes foliaires d'Esca n'apparaissent. Au niveau des feuilles, plusieurs activités (conductance stomatique, photosynthèse) ou composition en molécules (composés phénoliques) n'ont par contre été modifiées qu'après l'apparition de symptômes d'Esca sur ces organes.

Ces deux études complémentaires ont fait l'objet de deux publications, dont les principaux points des résumés en français sont les suivants :

**Ecophysiological impacts of Esca, a devastating grapevine trunk disease, on *Vitis vinifera* L. (travaux publiés dans la revue *Plos One* 14 (9) : e0222586.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222586>).**

L'Esca est une maladie du bois de la vigne causée par un large éventail de champignons pathogènes, non apparentés sur le plan taxonomique. Ces différentes espèces fongiques, attaquent les tissus du bois de la vigne et provoquent la formation de nécroses, pouvant atteindre les tissus vasculaires. La dégradation des vaisseaux fonctionnels, perturbe la physiologie des ceps et peut entraîner la mort de la plante de façon plus ou moins soudaine. Néanmoins, l'influence de l'Esca sur l'efficacité d'utilisation en eau de la vigne et le transport de sève à l'échelle de la plante entière, n'ont été que très peu étudiés. Dans cet article, une analyse détaillée des paramètres physiologiques liés au fonctionnement du xylème des vignes exprimant des symptômes foliaires d'Esca a été réalisée. Les expériences ont été réalisées dans un vignoble de la région de Bordeaux (France) sur le cépage Cabernet-Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) planté dans une parcelle où les ceps étaient suivis pour l'expression des symptômes foliaires d'Esca depuis 2 ans. Des capteurs de flux de sève ont été installés au cours de l'été sur différentes vignes. Lors de l'installation toutes les vignes

étaient saines et leurs feuilles asymptomatiques. Le potentiel hydrique, la conductance stomatique et la transpiration des feuilles ont également été mesurés. Les mesures physiologiques obtenues ont montré que la densité du flux de sève et la transpiration des vignes infectées par l'Esca, étaient significativement plus faible par rapport aux ceps témoins, une semaine avant l'apparition des premiers symptômes foliaires d'Esca. Plus généralement, lorsque la demande évaporatoire journalière atteint son climax, un taux de transpiration plus faible de 30% est enregistré sur les ceps devenus symptomatiques foliaires à l'Esca par la suite. Ces différences ont également été observées quelles que soient les températures et les valeurs de déficit en eau de l'air (VPD) mesurées. Au niveau des plants symptomatiques, de grandes quantités de bois nécrotique, spécifiquement de la pourriture blanche, ou amadou (plus de 10%), ont été observés au niveau du tronc et des bras. Ces données suggèrent que les nécroses ont un impact sur la réduction de la capacité hydraulique de la plante. Par ailleurs, cette étude corrobore le fait que l'utilisation de méthodes de surveillance physiologique, associées à la surveillance visuelle des symptômes foliaires, pourrait permettre de mesurer plus précisément le niveau de sévérité de l'Esca au vignoble.

Assessment of sap flow disruption related with the physiological and genetic responses following Esca infection of *Vitis vinifera* L. (va être soumis pour publication).

Les différentes espèces fongiques impliquées dans l'Esca attaquent les tissus du bois de la vigne et provoquent la formation de nécroses. Il peut en résulter une dégradation des vaisseaux fonctionnels, une perturbation de la physiologie des ceps et leur dépérissement à plus ou moins long terme. Dans cet article, une analyse détaillée des paramètres physiologiques liés au fonctionnement du xylème des vignes exprimant ou non les symptômes foliaires d'Esca, a été réalisée dans un vignoble de la région de Bordeaux (France) sur une parcelle dont le cépage est du Cabernet-Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) âgé de 17 ans et pour laquelle l'expression des symptômes d'Esca a été surveillée depuis sa plantation en 2005. Pendant deux saisons consécutives, des vignes saines (témoins) et exprimant l'Esca ont fait l'objet d'un diagnostic physiologique détaillé. Les mesures ont concerné : la transpiration de la plante entière enregistrée de manière continue pendant 10 à 12 semaines au moyen de capteurs de flux de sève non invasifs placés sur les bras des ceps, et des paramètres physiologiques mesurés au niveau des feuilles, tel que la conductance stomatique (g_s), régulièrement quantifiés. Des feuilles saines et d'autres symptomatiques ont

été prélevées à différents stades phénologiques, afin de comparer les profils d'expression de gènes (par RT-qPCR) impliqués dans le métabolisme primaire, avant et après la période d'apparition des symptômes. Cette étude a permis de montrer que la densité du flux de sève et la transpiration, sont significativement impactées par l'Esca (40 à 50% plus faibles), avant même que les symptômes foliaires n'apparaissent au vignoble. En effet, lorsque la demande évaporatoire journalière atteint son maximum, la transpiration mesurée sur des ceps infectés est significativement plus faible par rapport aux ceps témoins, plusieurs semaines avant l'apparition des premiers symptômes foliaires d'Esca. Les mesures réalisées au niveau des feuilles, i.e. conductance stomatique, activité photosynthétique et composés phénoliques, n'ont par contre pas permis de discriminer les ceps sains des ceps infectés, avant que les symptômes foliaires ne se développent. Ces mesures ne sont significativement impactées qu'après l'apparition de symptômes d'Esca sur les feuilles.

I. Encart : les capteurs de flux de sève

En fonction du type d'expérimentation et de l'espèce végétale considérée, différents types de capteurs de flux de sève peuvent être installés au niveau du tronc ou des tiges, afin de mesurer et quantifier la circulation d'eau *in planta*. Ces capteurs permettent tant d'évaluer la quantité d'eau prélevée par les différents tissus végétaux à l'échelle de la plante entière que de détecter les situations de stress hydriques. Les mesures des flux de sève, permettent également d'évaluer en continu la transpiration, c'est-à-dire le volume d'eau qui traverse la plante, des racines aux feuilles, sans que l'environnement de la feuille ne soit perturbé [355]. Il existe différentes méthodes pour mesurer le flux de sève, mais toutes reposent sur des principes thermiques de bilan de chaleur. Un élément chauffant fournit de l'énergie au système et les pertes de chaleur sont mesurées à l'aide de thermocouples. Les deux principales méthodes utilisées pour la vigne, que nous avons expérimentées dans cette thèse, sont également basées sur un calcul de bilan de chaleur [356–358]:

I.1. La méthode "Granier" de dissipation thermique.

La méthode « Granier » de dissipation thermique [354], utilisée et décrite dans le premier article, consiste à introduire deux sondes directement dans le bois d'aubier au niveau du tronc des ceps. Une première sonde chauffée en continu à puissance constante par effet Joule grâce à un enroulement de fil de constantan est insérée dans le tronc. Une seconde sonde, non chauffée, est installée environ 20 cm plus bas. L'ensemble du dispositif est ensuite recouvert d'isolants thermiques pour éviter les biais liés aux sources de chaleur externes. Comme décrit par Valancogne et Granier (1991) [359], en l'absence de flux de sève, l'écart de température entre les deux sondes s'établit à une valeur maximale d'équilibre. Lorsque la sève circule au voisinage de la sonde chaude, une partie de la chaleur fournie est évacuée par convection. Ainsi, l'écart de température entre les deux sondes est d'autant plus faible que le flux de sève est plus élevé. Le flux de sève est donc estimé par la mesure, en continu, des variations de température de la sonde chaude par rapport à celle non chauffée, dite « de référence » (Fig. 5).

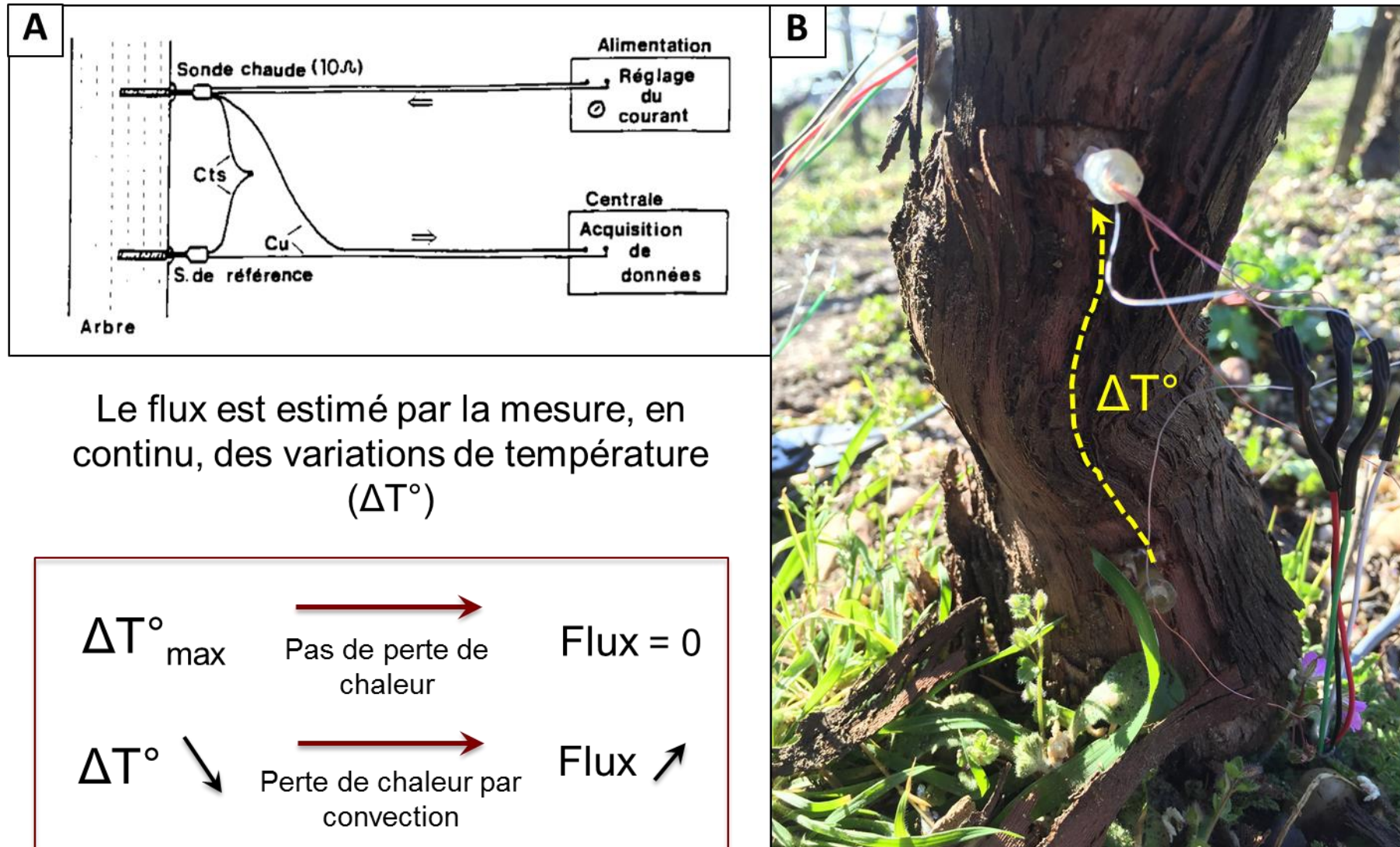


Figure 8: Illustration du dispositif expérimental de mesure de flux de sève selon la méthode "Granier" de dissipation thermique

I.2. La méthode par bilan de chaleur

La méthode par bilan de chaleur, utilisée et décrite dans le deuxième article consiste à réaliser simultanément, trois types de mesures (Fig. 6). Chaque capteur est constitué d'une gaine chauffée à température fixe (P_{in}), enroulée autour d'une tige de vigne, qui permet une triple acquisition d'écart de températures : une mesure radiale (Q_r) permet de calculer la différence de température entre le bois et le milieu extérieur et deux mesures axiales (q_u , q_d) permettent de mesurer la conduction de chaleur au travers de la tige. Ces quatre paramètres permettent de calculer la convection de chaleur transportée par la sève (Q_f), puis d'estimer le flux de sève selon la méthode de calcul décrite par Dynamax (2007) [360]. Les capteurs utilisés ont permis de mesurer les flux de sève en temps réel et de manière non-invasive. La flexibilité de la gaine permet d'ajuster le capteur à la section de tige choisie et d'optimiser la zone de contact entre les éléments chauffants du capteur et les flux de sève. Le capteur fournit ainsi de la chaleur de manière uniforme à travers le bois d'aubier. Une fois installé, le capteur est enveloppé d'un isolant thermique réfléchissant constitué d'une gaine en aluminium, afin de minimiser l'influence des radiations externes.

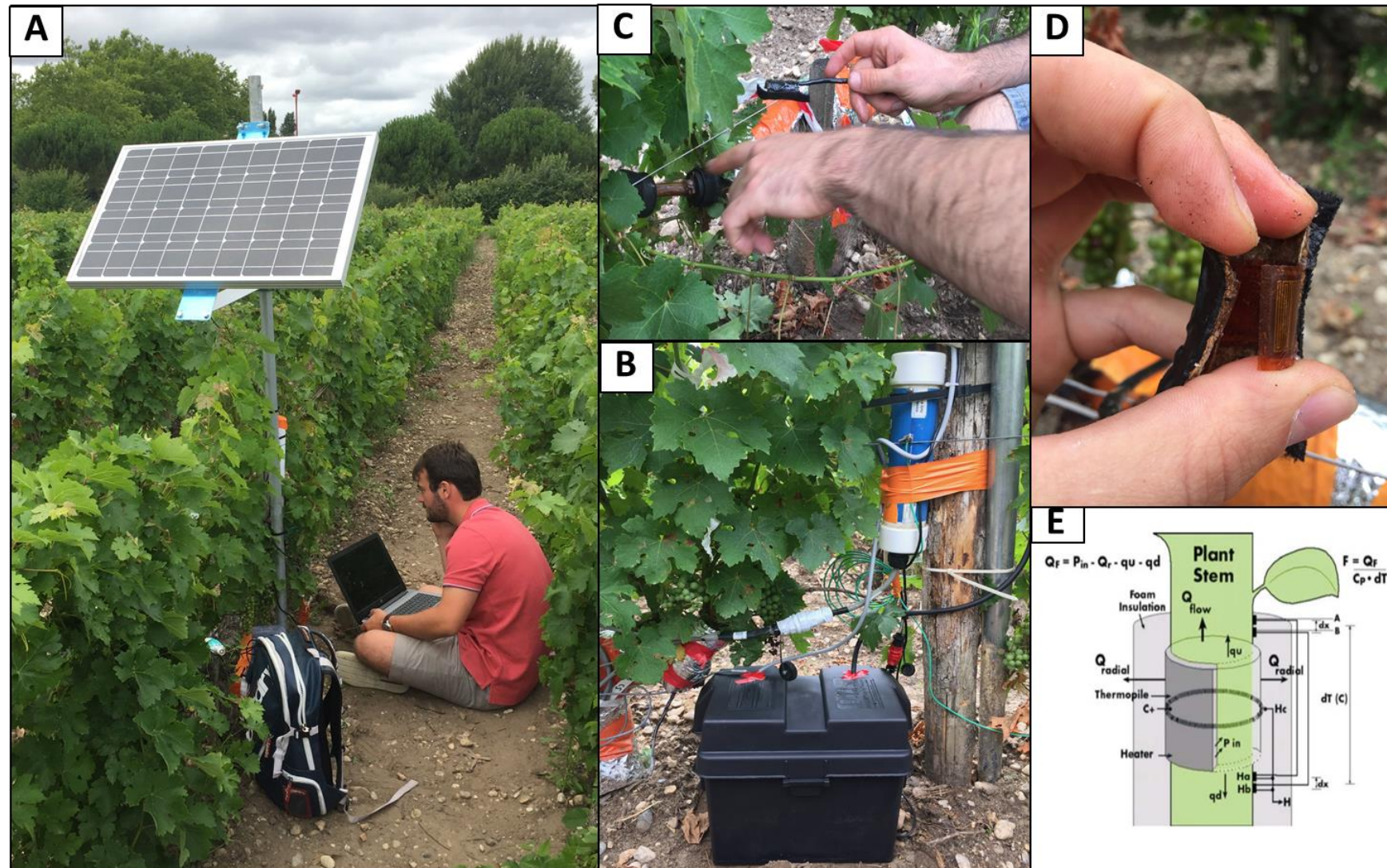


Figure 9: Illustration du dispositif expérimental de mesure de flux de sève selon la méthode par bilan de chaleur.

(A) panneau solaire permettant de recharger, par énergie solaire, la source d'alimentation des capteurs de flux de sève (B) batterie à décharge lente protégé par un caisson étanche (boîte noire) permettant d'alimenter les capteurs et sap IP (boîtier bleu et blanc) permettant l'enregistrement des données de flux de sève, (C) site d'installation des capteurs, (D-E) présentation des capteurs de flux de sève et illustration de leur schéma de fonctionnement.

II. Article 1



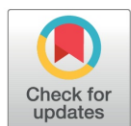
RESEARCH ARTICLE

Ecophysiological impacts of Esca, a devastating grapevine trunk disease, on *Vitis vinifera* L.

Loris Ouadi¹, Emilie Bruez^{1,2,3}, Sylvie Bastien^{1,2}, Jessica Vallance^{1,2}, Pascal Lecomte¹, Jean-Christophe Domec², Patrice Rey^{1,4*}

1 INRA, ISVV, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE), Villenave d'Ornon, France, **2** Bordeaux Sciences Agro, INRA UMR1391 Interactions Sol Plante Atmosphère (ISPA), Villenave d'Ornon, France, **3** Université de Bordeaux, ISVV, UR Œnologie, Villenave d'Ornon, France, **4** Université de Bordeaux, ISVV, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE), Bordeaux Sciences Agro, Villenave d'Ornon, France

* patrice.rey@inra.fr



OPEN ACCESS

Citation: Ouadi L, Bruez E, Bastien S, Vallance J, Lecomte P, Domec J-C, et al. (2019) Ecophysiological impacts of Esca, a devastating grapevine trunk disease, on *Vitis vinifera* L.. PLoS ONE 14(9): e0222586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222586>

Editor: Hemâni Gerós, Universidade do Minho, PORTUGAL

Received: December 14, 2018

Accepted: September 2, 2019

Published: September 19, 2019

Copyright: © 2019 Ouadi et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: Funding for this project was provided by the Industrial Chair GTDfree (French National Research Agency and the Hennessy Company) and Bordeaux Sciences Agro (PAL project). We also would like to acknowledge the support of the National Science Foundation, awards #NSF-EAR-1344703 and NSF-IOS-1754893. The funders had no role in study design, data collection and

Abstract

Esca is a Grapevine Trunk Disease (GTD) caused by a broad range of taxonomically unrelated fungal pathogens. These attack grapevine wood tissues inducing necroses even in the conductive vascular tissues, thus affecting the vine physiology and potentially leading to plant death. However, the influence of Esca on leaf and whole-plant water transport disruption remains poorly understood. In this paper, a detailed analysis of xylem-related physiological parameters in grapevines that expressed Esca-foliar symptoms was carried out. The experiments were conducted in a vineyard in the Bordeaux region (France) on cv. Cabernet-Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) grapevines, which were monitored for Esca-foliar symptoms over a two-year period. Heat dissipation sap-flow sensors were installed during the summer on grapevines having expressed or not Esca-foliar symptoms. Leaf water potential, stomatal conductance and leaf transpiration were also measured. Physiological monitoring showed that sap flow density and whole-plant transpiration of Esca-infected grapevines decreased significantly a week before the first foliar symptoms appeared. When atmospheric water demand (Vapour Pressure Deficit, VPD) was the highest, both parameters tended to be about twice as low in symptomatic grapevines as in asymptomatic ones. Sap flow density data at the maximum transpiration-time, was systematically 29–30% lower in Esca-infected grapevines compared to control plants before or after the appearance of Esca-foliar symptoms. This trend was observed whatever the temperatures and VPD values measured. In Esca-diseased plants, larger amounts of necrotic wood, mainly white rot, were found in the trunk and cordon of symptomatic grapevines compared to healthy ones, suggesting necroses have an influence in reducing the whole-plant hydraulic capacity. This study reveals that the use of physiological monitoring methods, together with the visual monitoring of foliar symptoms, could prove useful in providing accurate measurements of Esca disease severity.

analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Grapevine Trunk Diseases (GTDs) such as Esca, Eutypa and Botryosphaeria diebacks are among the most vineyard-destructive diseases, with their continuous spread threatening the sustainability of the vineyard worldwide. Over the last two decades, GTDs have become a major issue for the wine industry. The cost of replacing dead grapevines worldwide had been estimated at over 1.5 billion dollars per year [1], but that seems considerably underestimated when more local data are taken into account. In France, for instance, GTDs affect approximately 13% of the vineyards [2], with the French Wine Institute (IFV) estimating annual wine production losses at 1 billion euros. Extensive research has been carried out in recent years, with investigations focusing on epidemiology, aetiology, microbial ecology, host-pathogen relationships, and biocontrol [3–6]. So far, no effective alternative control methods are available for winegrowers [7], and no grapevine cultivars are known to be completely resistant to trunk diseases [8–11].

As regards Esca, the lack of effective control treatments has triggered great apprehension in the viticulture sector. Previously, sodium arsenite was the only pesticide registered in Europe to control Esca but it was banned in the early 2000s, because of its toxicity for both winegrowers and the environment [12,13,14]. However, the exponential growth of Esca symptoms has also been observed in countries that never used sodium arsenite (Germany: [15]; Switzerland: [16]). According to Fussler et al. [17], although sodium arsenite reduced the severity of Esca foliar symptoms, it had no incidence on plant mortality. Other factors, such as environmental ones or climate change, could be involved, but their role in the spread of the disease has not yet been determined.

Esca is a vascular wilt disease that attacks the perennial organs of grapevines, producing extensive wood necrosis in the trunk and cordon through the slow and systemic development of pathogenic fungi such as *Phaeoacremonium minimum*, *Fomitiporia mediterranea* and *Botryosphaeriaceae* species [18–22]. Esca is a complex disease, involving various biotic factors (pathogenic fungi), and abiotic factors possibly associated with cultural practices [6,23,24]. Fungal colonization of the wood can reach a critical point when the functional tissues are severely damaged, thus possibly interfering with the vine physiology, leading to Esca-foliar symptom expression and/or ultimately to plant death. Parameters such as type of cultivar, pruning methods, climate are frequently listed as factors affecting the development of Esca [23,24]. Two main forms of the disease have been described: (i) a chronic (or slow) form, involving characteristic “tiger-stripe” discolouration of the leaves and (ii) an acute (or apoplectic) form, characterised by a sudden drying of the leaves during the hot season, rapidly leading to the death of the vine. In recent years, Lecomte et al. [6] introduced a classification based on a graduated scale of severity, going from leaves showing some discoloration to total vine wilting. However, as the manifestation of the foliar symptoms may fluctuate from year to year, it is difficult to estimate the real incidence of the disease based only on the annual expression of symptoms on the leaves.

It has been reported that the volume of necrotic wood determines the probability of leaf symptoms occurrence [25] and, the volume of white rot within the grapevine wood increases the risk of developing apoplectic forms [26]. Altogether, these results [25,26] indicate that limiting or reducing the development of wood necrosis during the life of a vine is a critical element for an effective control of the disease. Specifically, Esca pathogens involved in the development of wood necrosis show varying ability to utilize nutrients made available in injured tissues [6]. Higher nutrient availability in xylem sap could lead to increased fungal growth over time [27], and potentially affect sap transport in infected vines.

Although grapevine sap flow is extremely sensitive to changes in sapwood functionality as well as to sudden changes in xylem pressure [28], few studies have been carried out on the dysfunction of the vascular system in Esca-infected vines and its consequences on the whole-plant physiology. As shown with pathogens inoculations on trees, obstruction of sap-conducting vessels can completely block the sap flow and cause stomatal closure [29]. In grapevines, a similar hydraulic blockage, consequent to the formation of necrosis in the sapwood, could disrupt stomatal conductance, reduce photosynthesis and CO₂ assimilation, restrain the production of sugars and other secondary compounds involved in plant resistance mechanisms against Esca-related pathogens.

In addition to whole-plant water use and leaf-level water status, in the present experiment, we also assessed the changes in the intrinsic Water Used Efficiency (iWUE) in Esca-diseased vs control grapevines by measuring the stomatal activity and the carbon concentration. Additionally, measurements of the combined variation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ allowed us to specify whether the modifications of iWUE, following changes in environmental conditions, had a stomatal or a biochemical (photosynthesis driven) origin [30,31].

As regards $\delta^{13}\text{C}$, in C3 plants such as grapevines, carbon and oxygen isotope ratios can be valuable indicators of grapevine water stress [32]. When water becomes a limiting factor, the stomata close during part of the day, thus slowing down CO₂ exchanges between the leaves and the atmosphere, and limiting ¹³C isotopic discrimination [33,34]. Under these conditions, the ¹³C/¹²C ratio ($\delta^{13}\text{C}$) in the primary products of photosynthesis approaches the one found in atmospheric CO₂ and varies according to the stress experienced by the plant [35–37]. Concerning $\delta^{18}\text{O}$, ¹⁸O enrichment in leaves can be induced by an increasing evaporative demand, and suggests that a corresponding increase in $\delta^{13}\text{C}$ is indicative of a drought-induced stomatal closure [38]. The ¹⁸O/¹⁶O ratio ($\delta^{18}\text{O}$) of leaf cellulose is largely determined by the integrated leaf-to-air vapour pressure gradient during photosynthetic gas exchange [39], and can be used to investigate changes in iWUE.

The objective of this study was to provide relevant information on the effect of Esca on grapevine ecophysiology, mainly on whole-plant water transport, leaf-level water status and gas exchanges. In the present paper, a detailed analysis of xylem-related physiological parameters in Cabernet-Sauvignon grapevines from the Bordeaux region that expressed, or not, Esca-foliar symptoms, was carried out. By monitoring sapwood, stomatal conductance and leaf transpiration rate, between asymptomatic and Esca-infected vines, we aimed at identifying and quantifying the physiological dysfunctions caused by the wood necroses on the circulatory activity of the whole plant. Additionally, we also used stable carbon isotope ratios as an index of iWUE to show how differences in physiological performance are related to the Esca disease.

Materials and methods

Plant material

Bordeaux Sciences Agro, the owner of the Chateau Luchey-Halde vineyard (Mérignac, Bordeaux region, France), gave permission to conduct the study. No specific permissions were required for these research activities since Bordeaux Sciences Agro promotes this type of experimental project. The field studies did not involve endangered or protected species.

In the Chateau Luchey-Halde vineyard, the study was conducted on 16-year-old Cabernet Sauvignon grapevines (*Vitis vinifera* L.), grafted on 10114 MG rootstock and planted on a sandy clay soil. Eight grapevine plants were selected, among which four expressed Esca-foliar symptoms in 2015 and four did not. The four vines that had continuously expressed Esca-foliar symptoms for at least two years in a row (2015 and 2016) were considered as Esca-infected. Similarly, the four vines that remained asymptomatic during this two-year period were considered as healthy.

Phenological observations were performed weekly, based on the international BBCH scale (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie) [40]. From 22nd June 2016 at the phenological stage 75 (fruit about half final size) on the BBCH scale to 27th July 2016 at stage 81 (beginning of ripening), three leaf-level physiological parameters were measured (stomatal conductance, leaf transpiration rates, and leaf water status that included stem and midday leaf water potentials). During this monitoring period, all experimentations were conducted on asymptomatic leaves. The first Esca-foliar symptoms were observed on 13th July 2016 at stage 76 (development of fruit). Then, the plants were uprooted and for each sampled vine, cordons and trunk were cut longitudinally to visualize and evaluate the necrotic and non-necrotic wood tissues in function of their length and localization. On each grapevine, two fully developed leaves were gathered from the medial part of each cordon then stored at -20°C prior to elemental and isotopic analyses. Healthy sapwood samples were also collected in the trunk and cordon of each vine and stored at -20°C prior to elemental and isotopic analyses. Whole-plant water transport (stem sap flow) was monitored from 5th May 2016 at stage 19 on the BBCH scale (first leaves fully expanded) to 28th July 2016 (stage 81) and thus encompassed the leaf-level physiological measurements.

Leaf gas exchange, water potentials and hydraulic conductance

Measurements of stomatal conductance (g_s) and leaf transpiration (E_{leaf}) were carried out with a Li-Cor 1600 steady state porometer (Li-Cor Corp., Lincoln, NE, USA) on each of the 8 sampled grapevines. Only sun-exposed and recently fully expanded leaves were measured, with a minimum of two replicates per cordon. The measurements were conducted every two days between 10:00 a.m. and 12:00 a.m., when both parameters reached their maximum values. As soon as Esca-foliar symptoms were noticed, the measurements were performed every day. However, because of the high frequency of phytosanitary treatments that occurred in the vineyard, which is common for this time of year in the Bordeaux wine region, a total of 13 days of measurements were possibly achieved.

For each grapevine, leaf water potentials were measured in the vineyard, on two fully-grown leaves sampled from each cordon [41]. The petiole was cut at its tip by a scalpel to preserve the tissues then introduced into the lid opening of a pressure chamber (SAM Précis 2000, Gradignan, France). Three types of water potentials were measured: 1) predawn water potential (ψ_{pd}) between 4:00 a.m. and 5:00 a.m., when the stomata are closed, and transpiration is negligible; 2) midday stem water potential between 10:00 a.m. and 11:00 a.m. on leaves that had been covered by an opaque, waterproof bag of aluminium at least one hour before the sampling [42], and 3) midday leaf water potential measured between 12:00 a.m. and 1:00 p.m. on sun-exposed leaves. For each day of measurement, gas exchange and water potentials were recorded concurrently to estimate whole-vine hydraulic conductance (K_{vine}) from the relationship between the rates of single-leaf E_{leaf} and soil-leaf water potential difference [43]. The soil water potential (ψ_{soil}) was considered to be very close to ψ_{pd} in the leaves [44], and thus K_{vine} was taken as:

$$K_{vine} = \frac{E_{leaf}}{(\psi_{pd} - \psi_{leaf})} \quad (1)$$

Similarly, leaf hydraulic conductance (K_{leaf}) was taken as:

$$K_{leaf} = \frac{E_{leaf}}{\psi_{stem} - \psi_{leaf}} \quad (2)$$

Sap flow and evapotranspiration measurements

The first day of sap flow measurement started May 5, 2016 (stage 19 on the BBCH scale), we measured sap flux density per unit of conducting xylem area (J_s , $\text{gH}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) on the eight selected grapevines. Stem sap flux measurements were made at 0.4 m above the ground using 10 mm heat dissipation probes [45], modified after the original 20 mm Granier's design [46]. Preliminary results from a nearby plot showed that there was no significant difference in azimuthal J_s within grapevines ($p = 0.42$, Student's paired t-test), probably as a result of sapwood homogeneity, so we inserted all probes on the north side of the vines. To account for natural axial gradients in temperatures between the heated and the reference probe due to soil heat exchange and therefore to reduce measurement noise [47], two additional and non-heated probes were inserted 4 cm to the right side of the primary probes [48]. In addition, stems were wrapped with reflective insulation using an aluminium sheath to minimize direct solar irradiance around the probes.

The sap flow density was estimated by continuously measuring the variations in temperature differences (ΔT) between a heating sensor operating at constant power and an identical non-heating sensor inserted upstream. The temperature of the heating sensor, maximum when the value of the sap flow is zero, decreases as the sap velocity grows, an increasing amount of heat being evacuated by convection. The signals from the sap flow probes were scanned every 30 seconds, and thirty-minute averages of temperature difference data were computed and stored in data loggers (CR1000; Campbell Scientific, USA) equipped with a 32-channel multiplexer (AM416; Campbell Scientific). The sensor signal was converted to J_s , according to [49] and accounted for the effects of nonzero night-time fluxes on the signal baseline by using nights with low vapour pressure deficit (VPD) to estimate maximum temperature differences on nights with nocturnal transpiration [50].

Using sapwood area of each grapevine and stand grapevine density, J_s was scaled and converted to a plot scale average transpiration per unit ground area and per day (TP , in $\text{mm}\cdot\text{d}^{-1}$ corresponding to $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$). From one day to the next, variations in the water content of the aerial part of grapevines are generally neglected as water storage compartment are refilled at night [42] and the daily TP was assimilated to the total sap flow cumulated over 24 hours as [51]:

$$TP = \sum_{t=1}^{24h} (J_s \cdot 3600)(S) \cdot 10^{-3} \quad (3)$$

where S is the total grapevine conductive surface area per soil area. First, the total sapwood area of the grapevines equipped with sap flow probes was estimated from the relationship between sapwood area and diameter. Then this relationship was applied to the 79 grapevines surrounding the plants equipped with sapflow sensors to calculate whole plot sapwood area and by proportionality estimate whole plot TP using vine planting density.

Necroses image-analyses

Once the physiological monitoring period was achieved, grapevines equipped with sapflow sensors were uprooted and cut longitudinally. One half of each trunk was then photographed for quantification of necrotic wood, which was, in comparison to apparently healthy wood, darker brown in colour and varied in texture from hard (necrotic-tissue) to soft and spongy (white-rot) (Fig 1). Necroses were evaluated according to the percentage of trunk area infected following [52]. The severity of each necrotic area was assessed from the photographs using the image-analysis software ImageJ (NIH, USA; <https://imagej.nih.gov/ij/>)

Leaf nitrogen concentration and stable isotope measurements

Leaf chemistry as well as stable carbon and oxygen isotopes were used to evaluate grapevine water use efficiency. Both leaves and wood samples were collected for nitrogen (N) concentration (in grams of N per dry gram of sample, and converted to %N), and for isotopic measurements of $\delta^{13}\text{C}$. For isotopic measurements of $\delta^{18}\text{O}$, only leaf tissues were used. As some grapevines only expressed Esca-foliar symptoms on one of their cordons, leaf samples were differentiated according to the cordon they were collected from. Specifically, two leaves per cordon were collected from each sampled vine on 27th July 2016 (stage 81 on the BBCH scale), before being ground in liquid nitrogen using a pestle and mortar then stored at -20°C before downstream analyses.

Similarly, following the uprooting of grapevine plants that occurred just after the leaf harvest, non-necrotic woody tissues were collected on the trunk and cordon of each sampled grapevine before being ground in liquid nitrogen with a one-ball mill of Dangoumau type and kept at -20°C prior to molecular analyses. After they were placed in the oven at 28°C overnight, 3 mg of each sample were weighed on an analytical balance and encased in tin foil capsules for both the determination of carbon and nitrogen concentrations and $\delta^{13}\text{C}$ analysis. A second set of leaf samples intended for $\delta^{18}\text{O}$ analysis was encased in silver capsules. The capsules were placed in a thermally sealed microplate and sent to the INRA-Nancy (France) for analysis. The $\delta^{13}\text{C}$ analyses were performed with an Elementar Analyser (Carlo Erba, Milano) coupled to a Finnigan continuous flow isotope ratio mass spectrometer (Delta S, Finnigan MAT, Bremen, Germany) and the $\delta^{18}\text{O}$ analyses were performed with a Pyrocube (Elementar, Hanau) coupled to an Isoprime (Manchester) at the stable isotope facility at Functional Ecology PTEF (OC 081) at INRA Nancy, France. The carbon isotopic composition was expressed according to the conventional δ (‰) notation:

$$\delta^{13}\text{C} = \left[\frac{R_S - R_{\text{PDB}}}{R_{\text{PDB}}} \right] * 1000 \quad (4)$$

where R_S and R_{PDB} are the molar abundance ratios of the carbon isotopes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in the sample and in the international standard for carbon called PDB (Pee Dee Belemnite) respectively [35]. The results were expressed in terms of the isotopic composition difference with the PDB ($\delta^{13}\text{C}$ PDB). According to [53], $\delta^{13}\text{C}$ PDB values of CO_2 are around -8‰ in the atmosphere and in plants vary from -9 to -34‰ .

Statistical analysis

Statistical analyses were performed in R software [54]. In order to determine whether or not our variables of interest were different according to the health status of the grapevines, analyses of variance (ANOVA) were performed for each physiological parameter. The normality of the residuals of the variables was tested using the Schapiro-Wilk test. When the validation tests were not significant, a non-parametric test was used (Kruskal-Wallis). The tests were taken as significant when $p < 0.05$.

Results

Esca-foliar symptoms and necrotic wood ratio

Before being uprooted, field notations were performed on the four asymptomatic (A1 to A4) and symptomatic (S1 to S4) grapevines selected for the experiment, to assess the presence of Esca-foliar symptoms (Table 1). Over the two-year monitoring period, changes in the expression of Esca disease occurred on S2. In 2015, only the left cordon of S2 showed Esca-foliar

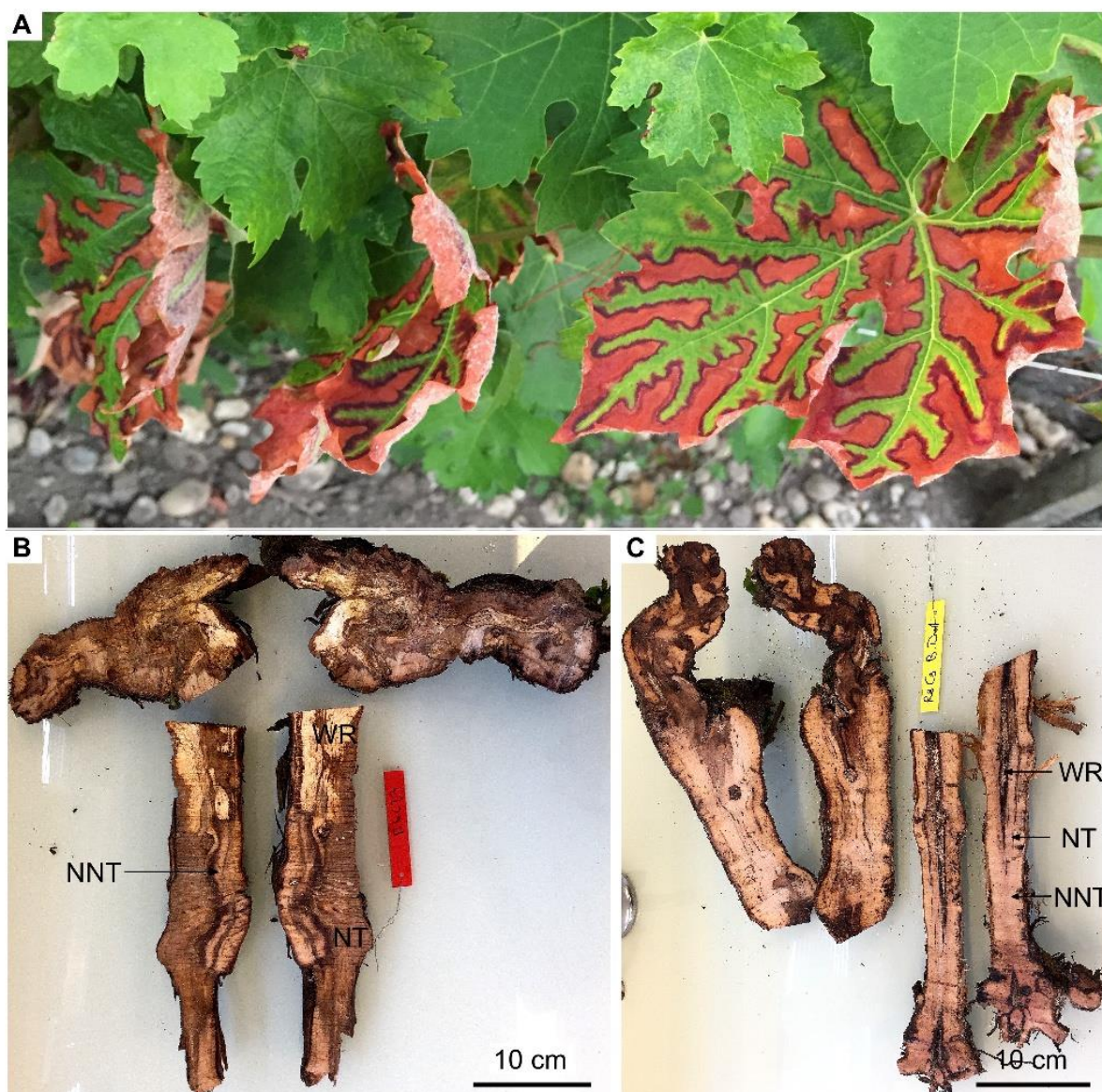


Fig 1. Symptoms expressions in Esca-infected Cabernet Sauvignon grapevines. (A) Grapevine showing tiger-stripe leaf symptoms associated with the chronic form of Esca. (B) Longitudinal section of an Esca-infected grapevine. Note the large area occupied by necrotic tissue (NT) and white rot (WR). (C) Longitudinal section of an asymptomatic grapevine in which most of the tissue is non-necrotic (NNT).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222586.g001>

symptoms, while both cordons presented symptomatic leaves in 2016. The left cordon of S4 suffered the apoplectic form of Esca in 2015 and is referred as dead (Table 1). The right cordon of A3 was torn out during the surveillance period and is referred as missing (Table 1).

When looking at the whole grapevine, trunk and cordon combined, larger amounts of necrotic-wood including white rot were found inside grapevines that expressed Esca-foliar symptoms (Fig 2). In symptomatic plants, white rot ratios consistently accounted for 15% to

Table 1. Notation table presenting the status of the 16-year-old Cabernet-Sauvignon cultivar (*Vitis vinifera* L.) sampled in 2015 and 2016. In the table, (-) stands for asymptomatic cordons and (+) stands for cordons that expressed Esca-foliar symptoms.

Vine		Esca-foliar symptoms in 2015		Esca-foliar symptoms in 2016	
		Left cordon	Right cordon	Left cordon	Right cordon
Asymptomatic	A1	-	-	-	-
	A2	-	-	-	-
	A3	-	-	-	Missing
	A4	-	-	-	-
Symptomatic	S1	+	-	+	-
	S2	+	-	+	+
	S3	+	+	+	+
	S4	Dead	+	Dead	+

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222586.t001>

50% of the total necrotic area regardless of the tissue considered. Even though no trace of white rot was found in the trunk of S2, when considering the whole plant, the share of white rot remained preponderant in comparison to the healthy grapevines. In asymptomatic grapevines, the necrotic-wood ratio remained low with less than 30% of the total wood surface being necrotic, and with a negligible proportion of white rot. The grapevine A1 that was healthy during the two-year survey had a total necrotic-wood ratio close to the other asymptomatic grapevines. Yet it was the only healthy grapevine that presented traces of white rot, accounting for less than 5% of the total wood surface in both the trunk and cordons.

Sap flow density and grapevine water use

The data selected to analyse the variation of sap flow were acquired continuously between stage 19 on the BBCH scale (10 leaves unfolded, i.e. early May) and stage 81 (beginning of ripening, i.e. late July), mostly when no Esca-foliar symptoms had yet appeared in the field, since the first symptoms were observed at stage 76 (development of fruit). No mechanical leaf pruning occurred between those dates. Two different sets of environmental conditions characterized the data-recording phase. The first period ranged from stage 61 (beginning of flowering, i.e. late May) to stage 76 (fruit about half-size; i.e. early July), when temperatures did not exceed 27°C and the mean maximum daily Vapour-Pressure Deficit (VPD) remained below 1.2 kPa. The second period starting at the end of stage 76 was marked by higher temperatures and evaporative demand, where midday VPD values were twice as high.

During stage 76 the diurnal time course of sap flux density reflected diurnal changes in ambient temperature and VPD. Note that no rainfall occurred over the 6 days preceding the onset of Esca-foliar symptoms. Sap flux density increased shortly after sunrise, reached a peak by 2:00 p.m. and decreased in the late afternoon (S1 Fig). No rainfall was recorded during this period (S2 Fig). The analysis of sap flow dynamics according to the health status of grapevines, one week before the onset of the first Esca-foliar symptoms, revealed two distinct kinetics. Although sap flow densities recorded in Esca-infected and control grapevines show a similar evolution, the average flow velocity measured around midday periods in grapevines that were about to develop Esca-foliar symptoms was significantly lower ($p < 0.05$), compared to controls plants. The end of stage 76, characterized by a warmer, drier climate than the previous days, sap flow densities in both control and symptomatic grapevines were amplified (Fig 3A). However, sap flow densities and whole-plant transpiration of grapevines that developed Esca-foliar symptoms were consistently lower in comparison with the control plants (Fig 3). To better estimate the water balance in symptomatic and asymptomatic plants, the conductive tissue area of each grapevine was taken into account to calculate the daily transpiration (Fig 3B, Fig

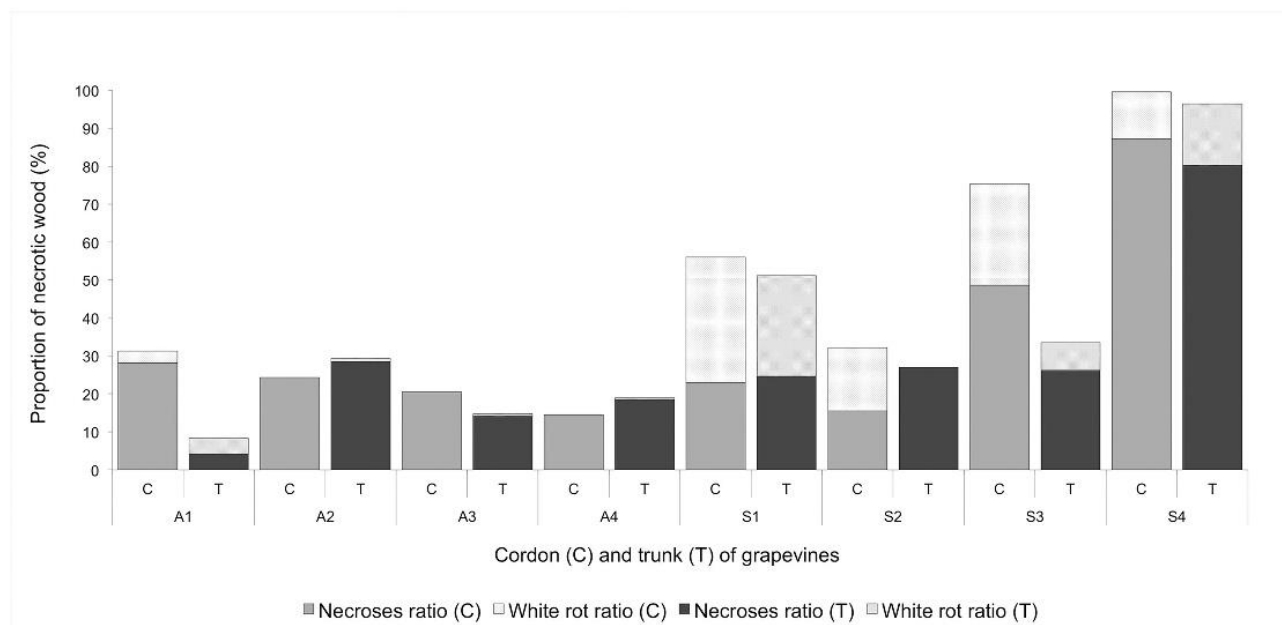


Fig 2. Percentage of necrosis and white rot in the trunk wood (T) and cordons (C) of asymptomatic (A) and symptomatic (S) grapevines.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222586.g002>

3C). On average, the transpiration ranged from 2 to 5 mm per day. The daily transpiration recorded in symptomatic grapevines was about 30% lower than in healthy plants ($p = 0.002$). This downward trend remained the same before and after the apparition of the foliar Esca symptoms (Fig 3B). Additionally, the relationship between transpiration values in asymptomatic vs. symptomatic grapevines did not appear to be particularly modified when climatic conditions were characterized by higher VPD (Fig 3C).

Leaf stomatal conductance, transpiration, and water status

From stage 75 on the BBCH scale to stage 76, when grapevines had not yet expressed any leaf symptoms, the average g_s was significantly higher ($p = 0.04$) in Esca-infected grapevines than in control plants ($169.3 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ vs $28.2 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectively) only two days before the first symptoms appeared (Fig 4A). This difference was also recorded at stage 77, one week after the onset of Esca-foliar symptoms ($p = 0.021$; Fig 4A). Consequently, E_{leaf} measured on that day on symptomatic leaves was also significantly higher ($2.05 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) than those from the asymptomatic ($0.78 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ones ($p = 0.06$; Fig 4B). After stage 81 (beginning of ripening), affected leaves started to significantly dry and curl, preventing accurate measurement of leaf transpiration (E_{leaf}) and stomatal conductance (g_s).

No conclusive and consistent differences in leaf water potentials between asymptomatic and symptomatic grapevines were recorded over the physiological monitoring period. For example, predawn water potential measured at the phenological stage 77 on the BBCH scale (bunch closure), was twice as low in symptomatic grapevines than in control plants, but then five days later those values were similar (Fig 5A). At the beginning of ripening (stage 81), stem leaf water potentials showed lower values in asymptomatic grapevines in comparison with healthy plants recorded (Fig 5B). No significant differences were obtained with midday leaf water potential (Fig 5C). Even though grapevines did not suffer from water stress as seen in

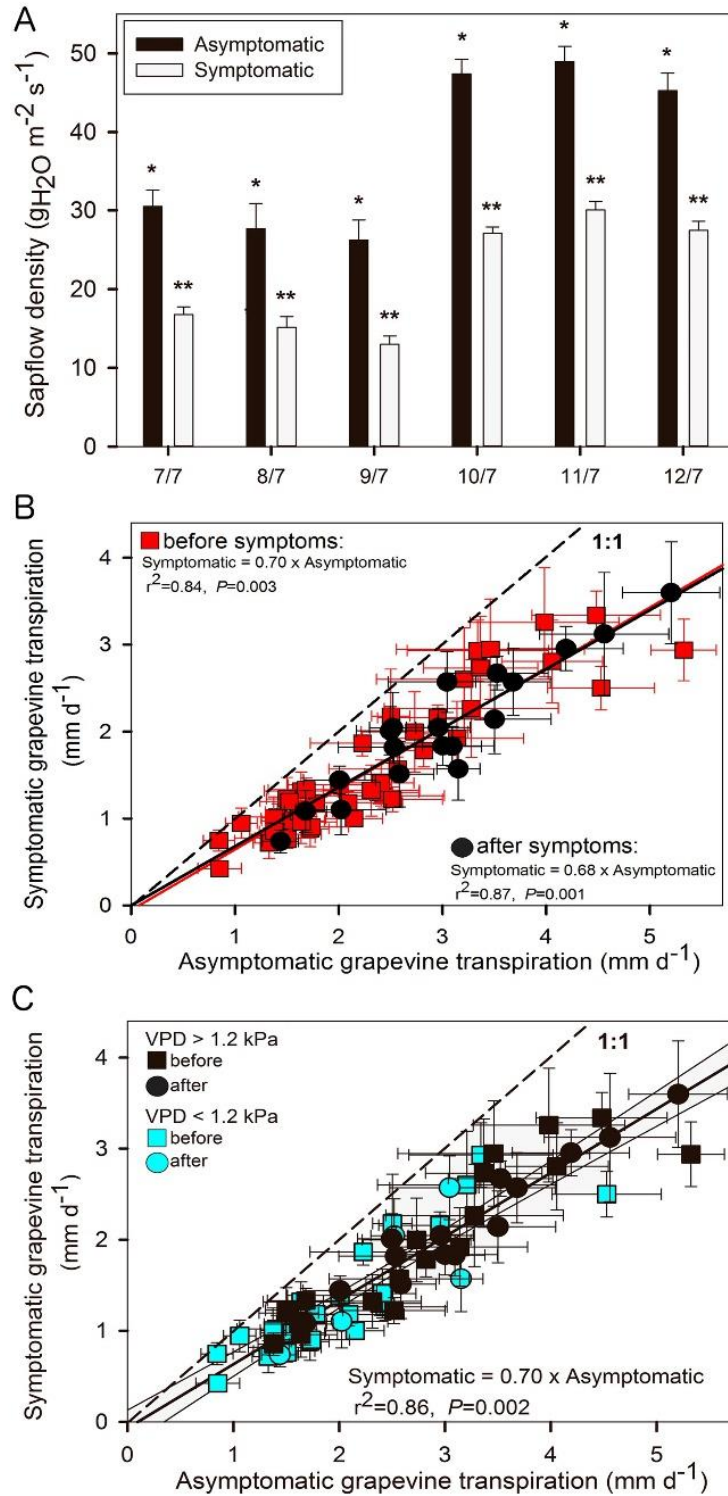


Fig 3. Comparison of daily sap flow densities and whole plant transpiration in asymptomatic and symptomatic Cabernet Sauvignon grapevines. (A) Mean maximum daily sap flow densities in asymptomatic and symptomatic grapevines during the week preceding the onset of Esca-foliar symptoms. Data represent transpiration values under non-limited light conditions, i.e. recorded between 10:00 a.m. and 4:00 p.m. Error bars represent SE and a different number of stars for a given date indicates a significant difference between asymptomatic and symptomatic grapevines at $p < 0.05$. (B) Mean daily transpiration in asymptomatic and symptomatic grapevines. Data were separated to reflect days "before" (red squares) and "after" (black circles) the apparition of the foliar Esca symptoms. Error bars represent SE. (C) Mean daily transpiration in asymptomatic and symptomatic grapevines. Data were separated to reflect days with high (black symbols) and low (blue symbols) maximum vapour pressure deficit (VPD), and to represent days "before" (squares) and "after" (circles) the apparition of the foliar Esca symptoms. Error bars represent SE.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222586.g003>

the similar values of whole-vine hydraulic conductance (K_{vine}), significant differences in leaf water status and leaf hydraulic conductance (K_{leaf}) were recorded between symptomatic and asymptomatic plants (Table 2). As a consequence the leaf resistance of symptomatic vines increased to more than 70% of the total root-to leaf hydraulic resistance.

Carbon, nitrogen concentrations and stable isotopes

There was no difference in carbon concentration (%C) in leaves, cordons and trunks between healthy and Esca-infected leaves (Fig 6A). However, nitrogen concentration (%N) of leaves that developed Esca-foliar symptoms in 2015 and 2016 was significantly lower ($p = 0.03$) in symptomatic ($N = 1.96 \pm 0.24\%$) than in control plants ($N = 2.74 \pm 0.14\%$) (Fig 6B). There was no difference in foliar oxygen isotope ratios $\delta^{18}\text{O}$ between healthy and infected vines (Fig 6C). Isotopic fractionation resulted in some quantitative differences in $\delta^{13}\text{C}$ between organs, with cordon and trunk signals being less negative, than leaves. Carbon isotope ratios $\delta^{13}\text{C}$ of necrotic wood tissues sampled from the trunk of symptomatic grapevines ($\delta^{13}\text{C} = -26.4 \pm 0.58\text{‰}$) was significantly more negative ($p = 0.04$) than in healthy grapevines ($\delta^{13}\text{C} = -24.8 \pm 0.26\text{‰}$), indicative of a decrease in instantaneous water use efficiency (iWUE) in Esca infested vines (Fig 6D).

Discussion

The image analyses that were performed on the longitudinal sections of grapevines revealed that the level of severity of internal necroses, mainly white rot, was higher in plants that had expressed Esca-foliar symptoms the two last years. As previously reported by Maler et al. [26], those results confirmed that the value of at least 10% of white rot in the cordons of grapevines is a strong descriptor for the chronic form of Esca.

The originality of this study lies in the adaptation of a physiological monitoring tool, mostly used on trees, to grapevine plants [55]. Thermal sapflow sensors adapted following Granier's design [46,49] were installed on asymptomatic and Esca-infected grapevine and different dynamics in sap flow density were recorded. Regardless of the date of appearance of Esca-foliar symptoms, sap flow density data around the maximum transpiration-time, was systematically about 30% lower in Esca-infected grapevines compared to control plants. This trend was observed whatever the temperatures and VPD values measured. Regardless of the health status of grapevines, the higher levels of sap flow density were recorded when the evaporative demand was particularly strong.

Results in grapevine were consistent with those of the literature that indicate that sap flow sensors are able to detect changes in hydraulic function prior to the onset of obvious visual symptoms, e.g. in walnut trees [56]. Here, the continuous physiological monitoring of sap flow made it possible to demonstrate changes, i.e. decrease in the water transport within Esca-diseased grapevines. Based on the greater amount of wood necroses in these plants, it can be suggested that the vascular system is altered. As a consequence, the loss of grapevine capacity to

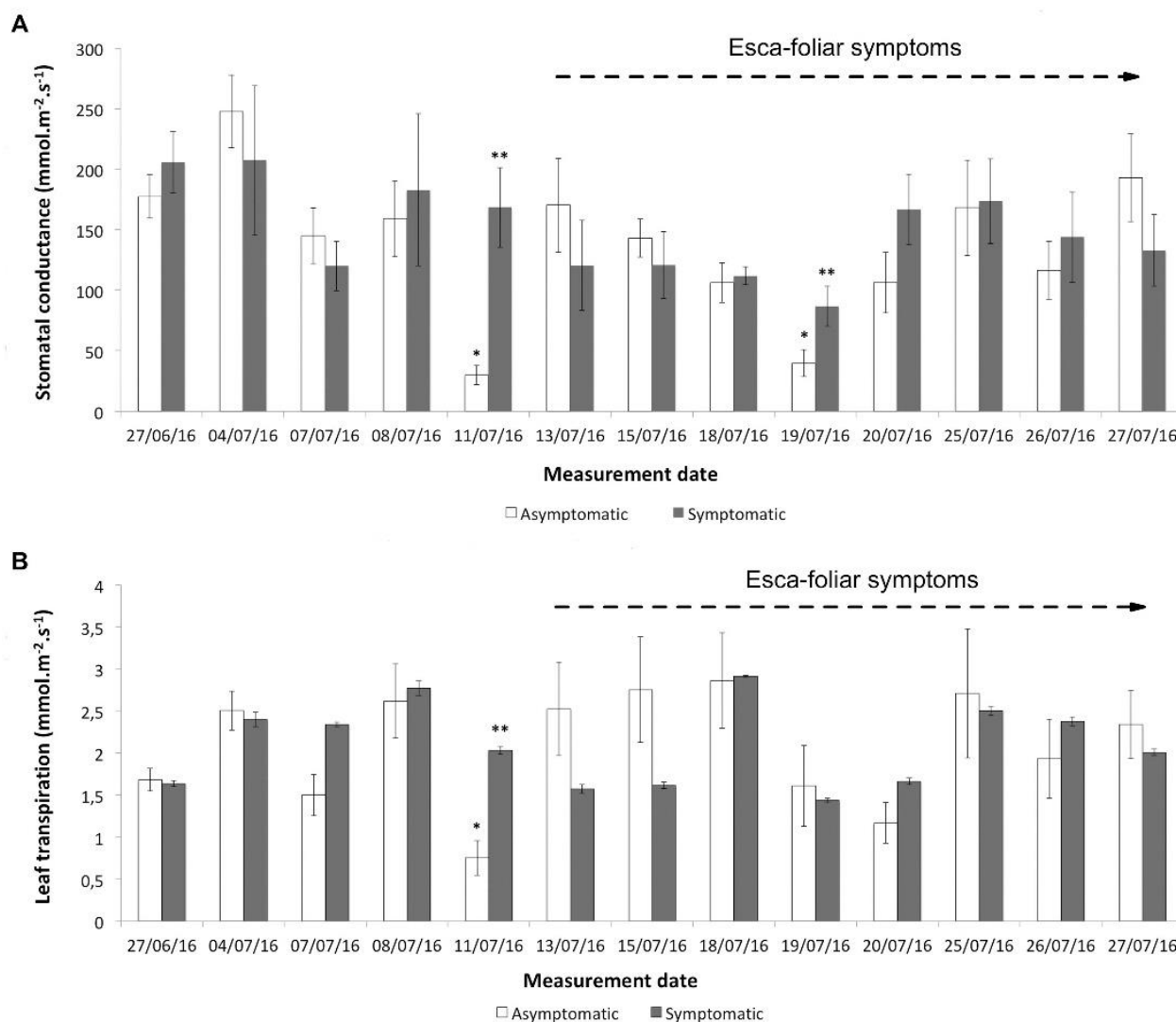


Fig 4. Evolution of stomatal conductance and leaf transpiration in asymptomatic and symptomatic Cabernet Sauvignon grapevines. (A) Average stomatal conductance in asymptomatic and symptomatic grapevines. (B) Average foliar transpiration in asymptomatic and symptomatic grapevines. The first Esca-foliar symptoms were observed on July 13th (stage 76 on the BBCH scale). Error bars represent SE and a different number of stars for a given date indicates a significant difference between asymptomatic and symptomatic grapevines at $p < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222586.g004>

transport water probably results from vessel occlusion due to the internal necrosis and the formation of tyloses and gels within vessels [57]. The number of functional vessels thus decreases and the circulatory activity of the whole plant is hindered.

The development of a non-destructive monitoring method to detect the early ecophysiological changes occurring in Esca-infected vines could improve the accuracy of the epidemiological surveillance network by adding key information on the plant functioning, beside the foliar symptoms that are currently monitored in GTD-epidemiological survey. A detailed

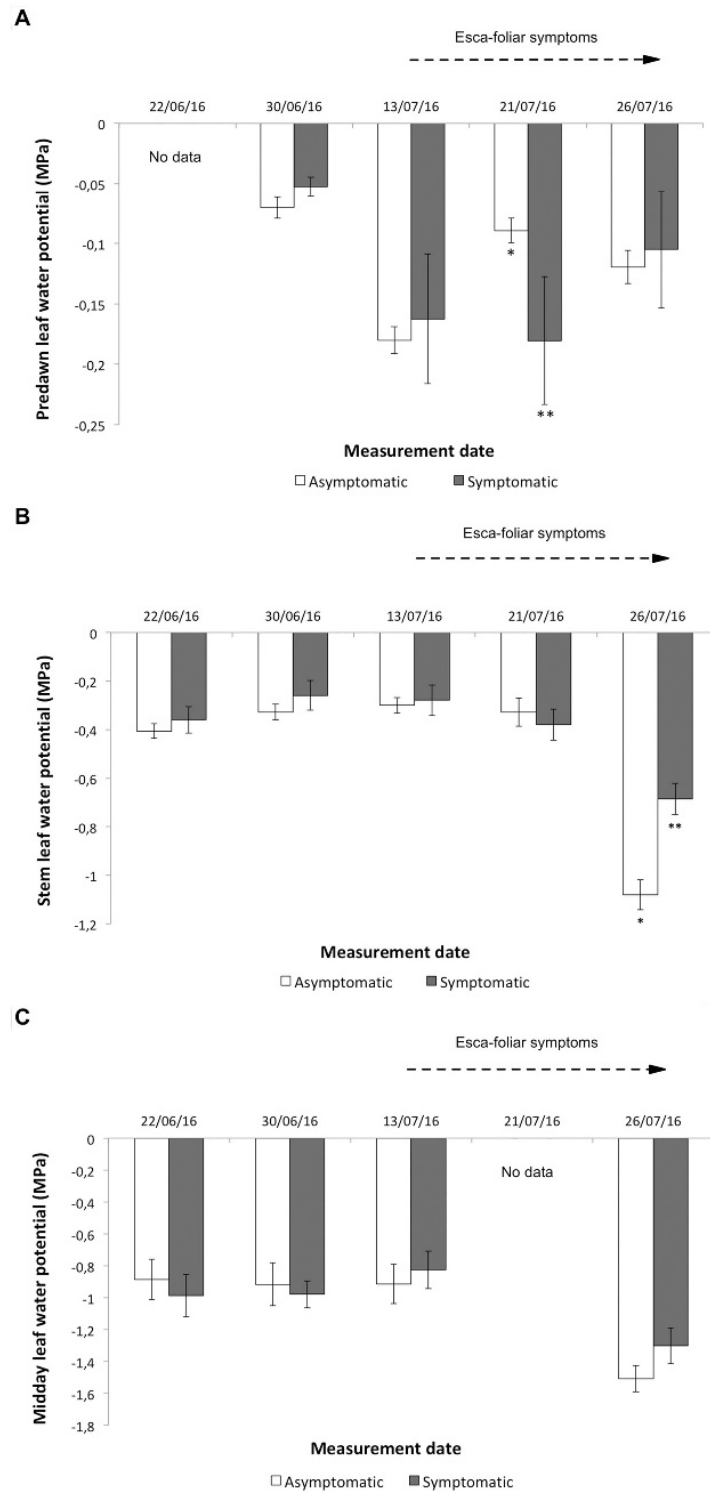


Fig 5. Evolution of water potentials in asymptomatic and symptomatic Cabernet Sauvignon grapevines. (A) Predawn leaf water potentials, (B) stem leaf water potentials, and (C) midday leaf water potentials in asymptomatic and symptomatic grapevines. The first Esca-foliar symptoms were observed on July 13th (stage 76 on the BBCH scale). No data were recorded for predawn water potential on June 22nd (A) and for leaf water potential on July 21st (C) due to bad weather conditions. Error bars represent SE. The different number of stars indicates a significant difference between asymptomatic and symptomatic grapevines at $p < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222586.g005>

quantification of xylem-related physiological parameters in the trunk and on the leaves of grapevines would also potentially provide accurate measurements of the disease severity.

Data recorded at the leaf level, i.e. stomatal conductance, leaf transpiration and water potential, leaf hydraulic conductance, were more difficult to analyse than those at the whole-plant level (from the sap flow sensors) due to the high variability of the measurements. Except for a few days, no clear significant differences were measured in grapevine expressing Esca-foliar symptoms and control plants, but other studies have observed differences. According to Petit et al. [58], Esca-symptomatic leaves are associated with both stomatal closure and alteration of the photosynthetic apparatus. However, the physiological mechanisms underlying the appearance of symptoms have not been yet identified. In this study, all measurements were performed on healthy leaves and no recurrent differences in g_s were recorded between Esca-infected grapevines and controls over the study period. During the season, the development of foliar symptoms in infected plants reduces their functional leaf area, as characterized by the tiger-stripe leaf symptoms (Fig 1). This loss of leaf active surface, associated with the decrease in sapflow densities recorded in symptomatic grapevines could explain why g_s remained nearly constant between healthy and infected grapevines. As shown by Pataky et al. [59], under identical conditions of temperature and humidity g_s within a plant is directly proportional to transpiration and inversely proportional to leaf area. Therefore, it is likely that the decrease in whole-vine sapflow and transpiration in infected vines (~30%, Fig 3) due to wood damage (Fig 2) was likely compensated by a proportional reduction in active foliage, thus maintaining a constant g_s (Fig 1).

In 2007, Edwards et al. [60] measured an increase of the leaf stomatal conductance in grapevine, which led directly to a water deficit (estimated by lower water potentials) in response to *P. chlamydospora* infections in 3-year-old potted plants that were maintained in greenhouse conditions. Our results can be explained by the environmental conditions in the vineyard that change from day to day, whereas they are much more stable and regulated in the greenhouse. Our results can also be regarded as the consequence of enlightenment, which is not high enough, to induce significant differences in the diseased and control plants, particularly before the onset of the foliar symptoms.

Predawn water potential measurements are assumed to be an indicator of available water in the soil [61]. The more negative predawn water potential of symptomatic grapevines just after the first Esca-foliar symptoms appearance indicated that infestation must have caused a form of resistance in the roots. This hypothesis is supported by the fact that all these grapevines, i.e.

Table 2. Impacts of the grapevine trunk disease Esca on hydraulic conductance of whole-vine (K_{vine}) and leaf (K_{leaf}) of Cabernet-Sauvignon cultivar (*Vitis vinifera* L.). Values shown are means from three different sampling dates where gas exchanges and water potentials were measured concurrently (from the end of flowering to berry ripening). Different letters within a row indicate a significant effect at $p < 0.05$.

	Asymptomatic	Symptomatic
K_{vine} (mmol m ⁻² MPa ⁻¹ s ⁻¹)	3.0 ± 0.6 a	2.4 ± 0.3 a
K_{leaf} (mmol m ⁻² MPa ⁻¹ s ⁻¹)	5.0 ± 0.3 a	3.4 ± 0.4 b
Resistance in leaves (%)	61 ± 15 b	72 ± 10 a

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222586.t002>

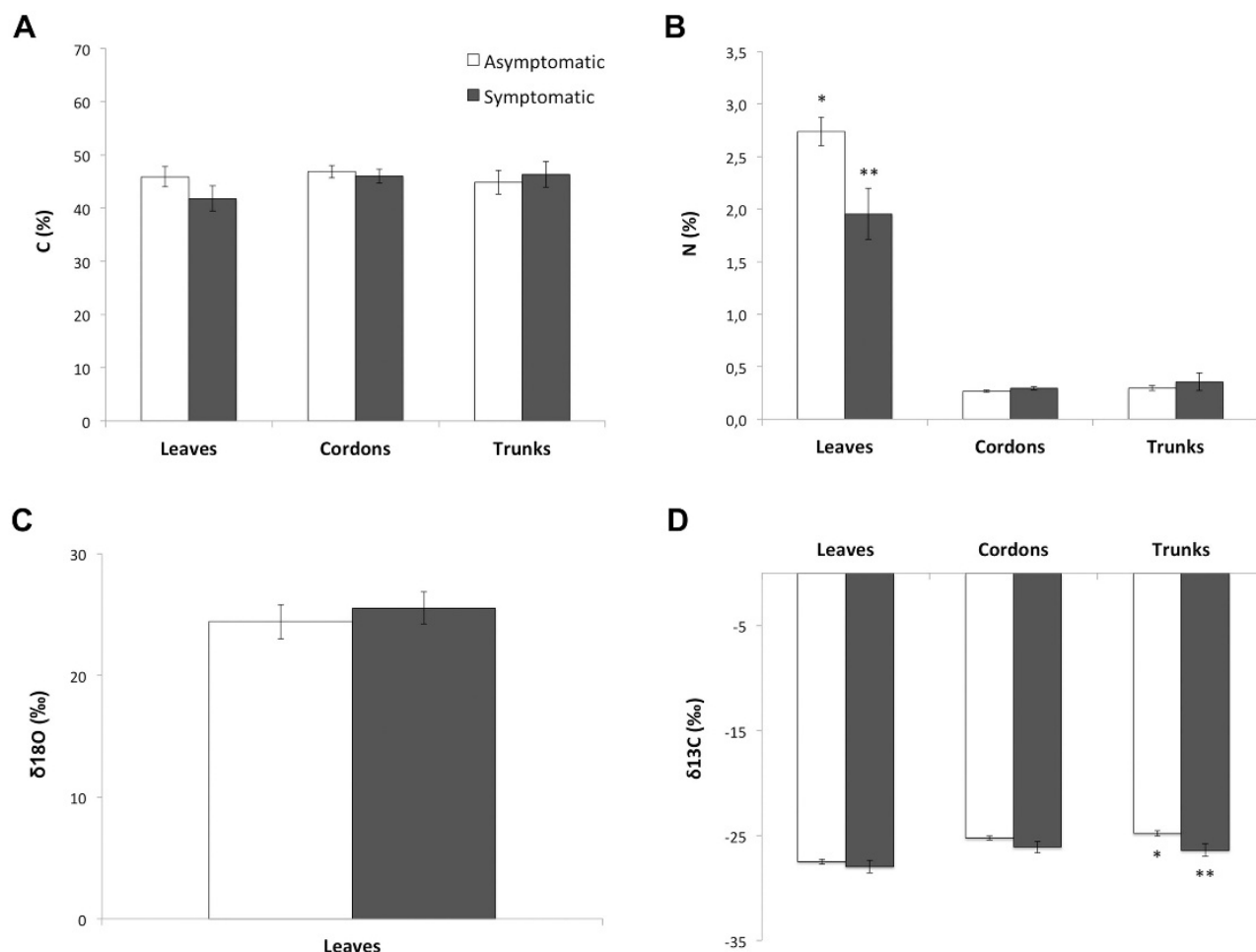


Fig 6. Elemental and isotopic analysis of leaf, cordon and trunk samples collected from symptomatic and asymptomatic grapevines. (A) Percentage of carbon and (B) percentage of nitrogen in leaves, cordons and trunks of symptomatic and asymptomatic grapevines. (C) Oxygen isotope discrimination ($\delta^{18}\text{O}$) in leaves and (D) carbon ($\delta^{13}\text{C}$) isotope discrimination in leaves, cordons and trunk of symptomatic and asymptomatic grapevines. For each type of measurement, non-necrotic samples were used. White Error bars represent SE and a different number of stars for a given tissue indicates a significant difference between asymptomatic (white columns) and symptomatic (black columns) grapevines at $p < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222586.g006>

diseased and control plants, were growing on the same site. It has been shown that, if roots are affected at the soil–root interface, soil–root resistance will increase and the ability of plants to take up water from the soil will diminished [62], as seen with the sap flow data. For instance, during a drought event, diseased-grapevines could be further compromised because of this added resistance.

Here, this increase in resistance was supported by the higher percentage of resistance that was measured on the leaves of Esca-diseased grapevines. Leaves comprise the terminal portion of the liquid water transport pathway and their xylem is under greater tension than in stems. The decline in hydraulic conductance of leaves (K_{leaf}) in Esca-foliar symptomatic grapevines was not the consequence of more native leaf water potentials, therefore some leaf structural adjustments explaining this increase in leaf hydraulic resistance occurred following leaf symptomatic expression. Although the hydraulic system of leaves represents less than 5% of the

total hydraulic pathway [63,64], we showed that a substantial (50–80%) and variable part of the resistance to water flow was located in the leaves. The tight coordination that exists between K_{leaf} and stomatal conductance (g_s) within and among species [65] implies that the large declines of K_{leaf} in Esca-diseased grapevines may be an inherent component of the stomatal regulatory system acting as a signal to reduce water flow.

To go further, measurements of stomatal conductance and carbon assimilation were used to estimate the instantaneous intrinsic Water Use Efficiency (iWUE). The combined variation of $\delta^{13}C$ and $\delta^{18}O$ allowed to specify whether the modifications in iWUE following changes in environmental conditions have a biochemical (photosynthesis driven) or a stomatal origin [30,31]. Unlike assessment of $\delta^{13}C$ in leaves, stem $\delta^{13}C$ measurements are less subject to time and daily climatic constraints, and reflect an integrative growing condition of the grapevines. The decrease in trunk $\delta^{13}C$ for the Esca diseased-grapevines indicated that over the long-term, iWUE decreased in these plants [33,66]. As for $\delta^{18}O$, there were no significant correlations differences in $\delta^{18}O$ between Esca-symptomatic and asymptomatic grapevines, suggesting that the variability in $\delta^{13}C$ was not driven by differences in g_s , but rather by reduced carbon assimilation, (i.e. a decrease in photosynthesis) [67]. This conclusion was supported by the lower nitrogen concentration, which means lower Rubisco activity, found in leaves that developed Esca-foliar symptoms than in control plants.

Conclusion

This study shows that the use of a physiological monitoring method to record changes in sap flow of grapevine over time is of the utmost interest to provide accurate information on Esca-disease severity. To go further, we suggest that the use of sap flow sensors over several years on a same group of Esca-infected and healthy grapevines would create a significant database allowing an in-depth analysis of the physiological response in terms of water transport efficiency. This could be of particular interest when grapevine that is Esca-symptomatic in year n , become asymptomatic in year $n+1$, then asymptomatic or symptomatic in year $n+2$, etc. Sap flow measurements over time of these plants will allow to report if "symptomatic then asymptomatic ones" have the same level of hydraulic conductance than "always healthy plants" or if they are suffering irreversible alterations and are thus, more susceptible to die in the coming years. This knowledge would have a significant impact on the management of grapevines expressing foliar symptoms of Esca at the vineyard.

Supporting information

S1 Fig. Evolution of sap flow densities in asymptomatic and symptomatic grapevines under different climatic conditions. (A) Diurnal courses of sap flow densities in asymptomatic and symptomatic grapevines during the week preceding the onset of Esca-foliar symptoms. (B) Evolution of temperature and vapour-pressure deficit conditions during the week preceding the onset of Esca-foliar symptoms. Error bars in panel (A) represent SE. (TIF)

S2 Fig. Total weekly rainfall (mm) during the 2016 grapevine growing season (1st March–30th September). (TIF)

Author Contributions

Conceptualization: Loris Ouadi, Emilie Bruez, Jean-Christophe Domec, Patrice Rey.

Formal analysis: Loris Ouadi, Emilie Bruez, Jessica Vallance, Jean-Christophe Domec.

Funding acquisition: Jean-Christophe Domec, Patrice Rey.

Investigation: Loris Ouadi, Emilie Bruez, Sylvie Bastien, Jessica Vallance, Pascal Lecomte, Jean-Christophe Domec, Patrice Rey.

Methodology: Loris Ouadi, Emilie Bruez, Sylvie Bastien, Jessica Vallance, Pascal Lecomte, Jean-Christophe Domec.

Project administration: Jean-Christophe Domec, Patrice Rey.

Supervision: Jean-Christophe Domec, Patrice Rey.

Validation: Jean-Christophe Domec, Patrice Rey.

Writing – original draft: Loris Ouadi, Emilie Bruez, Jean-Christophe Domec.

Writing – review & editing: Jean-Christophe Domec, Patrice Rey.

References

1. Hofstetter V, Buyck B, Croll D, Viret O, Couloux A, Gindro K. What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? *Fungal Diversity*. 2012; 1(54): 51–67.
2. Grosman J, Doublet B. Maladies du bois de la vigne: synthèse des dispositifs d'observation au vignoble, de l'observatoire 2003–2008 au réseau d'épidémiosurveillance actuel. *Phytoma*. 2012; 651(2): 31–34.
3. Bruez E. Etude comparative des communautés fongiques et bactériennes colonisant le bois de ceps de vigne ayant exprimé ou non des symptômes d'esca. Thesis, University of Bordeaux. 2013. Available from: <http://www.theses.fr/2013BOR22027>
4. Gerbore J, Vallance J, Yacoub A, Delmotte F, Grizard D, Regnault-Roger C, Rey P. Characterization of *Pythium oligandrum* populations that colonise rhizosphere of vines from the Bordeaux region. *FEMS Microbiology Ecology*. 2014; 90(1): 153–167. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12380> PMID: 25041717
5. Pierron R. Esca et vigne: compréhension des mécanismes de défense précoces du bois de la vigne *Vitis vinifera* L. suite à la maladie, colonisation des champignons in planta et proposition de moyens de lutte pour une viticulture durable. Thesis, University of Toulouse. 2015. Available from: <http://www.theses.fr/2015INPT0027>
6. Lecomte P, Darrieutort G, Liminana J-M, Comont G, Muruamendiarráz A, Legorburu F-J et al. New insights into Esca of grapevine: the development of foliar symptoms and their association with xylem discoloration. *Plant Disease*. 2012; 96(7): 924–934. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-11-0776-RE> PMID: 30727208
7. Bertsch C, Ramírez-Suero M, Magnin-Robert M, Larignon P, Chong J, Abou-Mansour E, et al. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology*. 2013; 62(2): 243–265.
8. Surico G, Mugnai L, Marchi G. Older and more recent observations on esca: a critical overview. *Phytopathologia Mediterranea*. 2006; 45(1): 1000–1019.
9. Wagschal I, Abou-Mansour E, Petit A, Clément C, Fontaine F. Wood diseases of grapevine: A review on eutypa dieback and esca. In: Ait Barka E, Clément C, editors. *Plant-Microbe Interactions*. Kerala, India; 2008. pp. 367–391.
10. Larignon P, Fontaine F, Farine S, Clément C, Bertsch C. Esca et Black Dead Arm: deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la Vigne. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. 2009; 332(9): 765–783.
11. Bellée A, Comont G, Nivault A, Abou-Mansour E, Coppin C, Dufour MC, et al. Life traits of four *Botryosphaeriaceae* species and molecular responses of different grapevine cultivars or hybrids. *Plant Pathology*. 2017; 66(5): 763–776.
12. Harmandon F. Effets toxiques de l'arsénite de sodium sur la santé humaine et exposition des utilisateurs. *Rencontre Techniques: Les maladies du bois en Midi-Pyrénées*. 2004; 8–12.
13. Larignon P, Fontaine F, Bertsch C. Les maladies du bois de la vigne: L'arsénite de sodium de nouveau à l'étude. *Le Vigneron Champenois*. 2014; 135(10): 27–29.
14. Mondello V, Larignon P, Armengol J, Kortekamp A, Vaczy K, Prezman F, et al. Management of grapevine trunk diseases: knowledge transfer, current strategies and innovative strategies adopted in Europe. *Phytopathologia Mediterranea*. 2019; 57(3): 369–383.

15. Fischer M, Kassemeyer HH. Fungi associated with esca disease of grapevine in Germany. *Vitis*. 2003; 42(3): 109–116.
16. Viret O, Bloesch B, Fabre AL, Taillens J, Siegfried W. L'esca en Suisse: situation en 2001 et évolution en 2004. *Rencontre Techniques: Les maladies du bois en Midi-Pyrénées*. 2012; 46–49.
17. Fussler L, Kobes N, Bertrand F, Maumy M, Grosman J, Savary S. A characterization of grapevine trunk diseases in France from data generated by the National Grapevine Wood Diseases Survey. *Phytopathology*. 2008; 98(5): 571–579. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-5-0571> PMID: 18943225
18. Crous PW, Gams W, Wingfield MJ, van Wyk PS. *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections. *Mycologia*. 1996; 88(5): 786–796.
19. Larignon P, Dubos B. Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*. 1997; 103(2): 147–157.
20. Fischer M. Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine: a worldwide perspective. *Phytopathologia Mediterranea*. 2006; 45(4): 30–42.
21. Mostert F, Halleen P, Fourie P, W. Crous. A review of *Phaeoacremonium* species involved in Petri disease and asca of grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*. 2006; 45(1): 1000–1018.
22. Pouzoulet J, Mailhac N, Couderc C, Besson X, Daydé J, Lummerzheim M, et al. A method to detect and quantify *Phaeoacremonium chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* DNA in grapevine-wood samples. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2013; 97(23): 10163–10175. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5299-6> PMID: 24136470
23. Lecomte P, Diarra B, Carbonneau A, Rey P, Chevrier C. Esca of grapevine and training practices in France: results of a 10-year survey. *Phytopathologia Mediterranea*. 2018; 57(3): 472–487.
24. Travadon R, Lecomte P, Diarra B, Lawrence DP, Renault D, Ojeda H, et al. Grapevine pruning systems and cultivars influence the diversity of wood-colonizing fungi. *Fungal Ecology*. 2016; 24(Part A): 82–93.
25. Lecomte P, Darrieutort G, Liminana J, Louvet G, Tandonnet J, Guérin-Dubrana L, et al. Esca de la vigne. II. Vers une gestion raisonnée des maladies de dépérissement. *Phytoma*. 2008; (616): 37–41.
26. Maher N, Piot J, Bastien S, Vallance J, Rey P, Guérin-Dubrana L. Wood necrosis in esca-affected vines: types, relationships and possible links with foliar symptom expression. *OENO One*. 2012; 46(1): 15–27.
27. Lima MRM, Machado AF, Gubler WD. Metabolomic study of chardonnay grapevines double stressed with esca-associated fungi and drought. *Phytopathology*. 2017; 107(6): 669–680. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-16-0410-R> PMID: 28402211
28. Carbonneau A, Deloire A, Torregrosa L, Jaillard B, Pellegrino A, Métaï A, et al. The grapevine: physiology, terroir, growing. 2nd edition. Dunod; 2015.
29. Domec JC, Rivera LN, King JS, Peszlen I, Hain F, Smith B, et al. Hemlock woolly adelgid (*Adelges tsugae*) infestation affects water and carbon relations of eastern hemlock (*Tsuga canadensis*) and Carolina hemlock (*Tsuga caroliniana*). *New Phytologist*. 2013; 199(2): 452–463. <https://doi.org/10.1111/nph.12263> PMID: 23560452
30. Scheidegger Y, Saurer M, Bahn M, Siegwolf R. Linking stable oxygen and carbon isotopes with stomatal conductance and photosynthetic capacity: a conceptual model. *Oecologia*. 2000; 125(3): 350–357. <https://doi.org/10.1007/s004420000466> PMID: 28547329
31. Dawson TE, Mambelli S, Plamboeck AH, Templer PH, Tu KP. Stable isotopes in plant ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 2002; 33(1): 507–559.
32. Leeuwen C, Gaudillère JP, Trégoat O. The assessment of vine water uptake conditions by ¹³C/¹²C discrimination in grape sugar. *OENO One*. 2001; 35(4): 195–205.
33. Farquhar GD, O'Leary MH, Berry JA. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*. 1982; 9(2): 121–137.
34. Brugnoli E, Hubick KT, von Caemmerer S, Wong SC, Farquhar GD. Correlation between the carbon isotope discrimination in leaf starch and sugars of C3 plants and the ratio of intercellular and atmospheric partial pressures of carbon dioxide. *Plant Physiology*. 1988; 88(4): 1418–1424. <https://doi.org/10.1104/pp.88.4.1418> PMID: 16666476
35. Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology*. 1989; 40(1): 503–537.
36. Farquhar GD, Lloyd J, Taylor JA, Flanagan LB, Syvertsen JP, Hubick KT, et al. Vegetation effects on the isotope composition of oxygen in atmospheric CO₂. *Nature*. 1993; 363(6428): 439–443.
37. Gaudillère JP, van Leeuwen C, Ollat N. Carbon isotope composition of sugars in grapevine, an integrated indicator of vineyard water status. *Journal of Experimental Botany*. 2002; 53(369): 757–763. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.369.757> PMID: 11886896

38. Barbour MM, Walcroft AS, Farquhar GD. Stable oxygen isotope composition of plant tissue: a review. *Functional Plant Biology*. 2007; 34(2): 83–94.
39. Kahmen A, Sachse D, Arndt SK, Tu KP, Farrington H, Vitousek PM, et al. Cellulose $\delta^{18}\text{O}$ is an index of leaf-to-air vapor pressure difference (VPD) in tropical plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108(5): 1981–1986.
40. Meier U. BBCH-monograph: growth stages of mono- and dicotyledonous plants. *Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry*. 2001; 130–133.
41. Scholander PF, Bradstreet ED, Hemmingsen EA, Hammel HT. Sap Pressure in vascular plants: negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science*. 1965; 148(3668): 339–346. <https://doi.org/10.1126/science.148.3668.339> PMID: 17832103
42. Meinzer FC, Johnson DM., Lachenbruch B, McCulloh KA, Woodruff DR. Xylem hydraulic safety margins in woody plants: coordination of stomatal control of xylem tension with hydraulic capacitance. *Functional Ecology*. 2009; 23(5): 922–930.
43. Loustau D, Domec JC, Bosc A. Interpreting the variations in xylem sap flux density within the trunk of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.): application of a model for calculating water flows at tree and stand levels. *Annals of Forest Science*. 1998; 55: 29–46.
44. Bréda N, Huc R, Granier A, Dreyer E. Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. *Annals of Forest Sciences*. 2006; 63(6): 625–644.
45. Domec JC, Schäfer K, Oren R, Kim HS, McCarthy HR. Variable conductivity and embolism in roots and branches of four contrasting tree species and their impacts on whole-plant hydraulic performance under future atmospheric CO₂ concentration. *Tree Physiology*. 2010; 30(8): 1001–1015. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq054> PMID: 20566583
46. Granier A. Une nouvelle méthode pour la mesure du flux de sève brute dans le tronc des arbres. *Annales des Sciences Forestières*. 1985; 42(2): 193–200.
47. Goulden ML, Field CB. Three methods for monitoring the gas exchange of individual tree canopies: ventilated-chamber, sap-flow and Penman-Monteith measurements on evergreen oaks. *Functional Ecology*. 1994; 8(1): 125–135.
48. Pangle RE, Limousin JM, Plaut JA, Yopez EA, Hudson PJ, Boutz AL, et al. Prolonged experimental drought reduces plant hydraulic conductance and transpiration and increases mortality in a piñon-juniper woodland. *Ecology and Evolution*. 2015; 5(8): 1618–1638. <https://doi.org/10.1002/ece3.1422> PMID: 25937906
49. Granier A. Evaluation of transpiration in a Douglas-fir stand by means of sap flow measurements. *Tree Physiology*. 1987; 3(4): 309–320. <https://doi.org/10.1093/treephys/3.4.309> PMID: 14975915
50. Ward EJ, Domec JC, King J, Sun G, McNulty S, Noormets A. TRACC: an open source software for processing sap flux data from thermal dissipation probes. *Trees*. 2017; 31(5): 1737–1742.
51. Domec JC, Palmroth S, Ward E, Maier CA, Thérézien M, Oren R. Acclimation of leaf hydraulic conductance and stomatal conductance of *Pinus taeda* (loblolly pine) to long-term growth in elevated CO₂ (free-air CO₂ enrichment) and N-fertilization. *Plant, Cell & Environment*. 2009; 32(11): 1500–1512.
52. Liminana JM, Pacreau G, Boureau F, Menard E, David S, Himonnet C, et al. Inner necrosis in grapevine rootstock mother plants in the Cognac area (Charentes, France). *Phytopathologia Mediterranea*. 2009; 48(1): 92–100.
53. Smith BN, Epstein S. Biogeochemistry of the stable isotopes of hydrogen and carbon in salt marsh biota. *Plant Physiology*. 1970; 46(5): 738–742. <https://doi.org/10.1104/pp.46.5.738> PMID: 16657539
54. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016. Available from: <https://www.r-project.org/>
55. Cabibel B, Do F, Horoyan J. Mesures thermiques des flux de sève dans les troncs et les racines et fonctionnement hydrique des arbres. I. Analyse théorique des erreurs sur la mesure des flux et validation des mesures en présence de gradients thermiques extérieurs. *Agronomie*. 1991; 11(8): 669–678.
56. McElrone AJ, Grant JA, Kluepfel DA. The role of tyloses in crown hydraulic failure of mature walnut trees afflicted by apoplexy disorder. *Tree Physiology*. 2010; 30(6): 761–772. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq026> PMID: 20447983
57. Pouzoulet J, Pivovarov AL, Santiago LS, Rolshausen PE. Can vessel dimension explain tolerance toward fungal vascular wilt diseases in woody plants? Lessons from Dutch elm disease and esca disease in grapevine. *Frontiers in Plant Science*. 2014; 5(253): 1–11.
58. Petit AN, Vaillant N, Boulay M, Clement C, Fontaine F. Alteration of photosynthesis in grapevines affected by esca. *Phytopathology*. 2006; 96(10): 1060–1066. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1060> PMID: 18943493

59. Pataki DE, Oren R, Phillips N. Responses of sap flux and stomatal conductance of *Pinus taeda* L. trees to stepwise reductions in leaf area. *Journal of Experimental Botany*. 1998; 49(322): 871–878.
60. Edwards J, Pascoe IG, Salib S. Impairment of grapevine xylem function by *Phaeomonilia chlamydospora* infection is due to more than physical blockage of vessels with “goo”. *Phytopathologia Mediterranea*. 2007; 46(1): 1000–1004.
61. Ritchie GA, Hinckley TM. The pressure chamber as an instrument for ecological research. *Advances in Ecological Research*. 1975; 9: 165–254.
62. Barataud F, Moyne C, Bréda N, Granier A. Soil water dynamics in an oak stand. *Plant and Soil*. 1995; 172(1): 29–43.
63. Sack L, Holbrook NM. Leaf hydraulics. *Annual Review of Plant Biology*. 2006; 57(1): 361–381.
64. Johnson DM, Wortemann R, McCulloh KA, Jordan-Meille L, Ward E, Warren JM, et al. A test of the hydraulic vulnerability segmentation hypothesis in angiosperm and conifer tree species. *Tree Physiology*. 2016; 36(8): 983–993. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpw031> PMID: 27146334
65. Brodribb TJ, Holbrook NM. Stomatal closure during leaf dehydration, correlation with other leaf physiological traits. *Plant Physiology*. 2003; 132(4): 2166–2173. <https://doi.org/10.1104/pp.103.023879> PMID: 12913171
66. Zhang JW, Feng Z, Cregg BM, Schumann CM. Carbon isotopic composition, gas exchange, and growth of three populations of ponderosa pine differing in drought tolerance. *Tree Physiology*. 1997; 17(7): 461–466. <https://doi.org/10.1093/treephys/17.7.461> PMID: 14759838
67. Barbour MM, Walcroft AS, Farquhar GD. Seasonal variation in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of cellulose from growth rings of *Pinus radiata*. *Plant, Cell & Environment*. 2002; 25(11): 1483–1499.

III. Article 2 (en voie de soumission)

Assessment of sap flow disruption related with the physiological and genetic responses following Esca infection of *Vitis vinifera* L.

Loris Ouadi¹, Emilie Bruez^{1,2,4}, Sylvie Bastien^{1,2}, Amira Yacoub¹, Cindy Coppin⁵,
Florence Fontaine⁵, Jean-Christophe Domec² and Patrice Rey^{1,3}

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

² Bordeaux Sciences Agro, INRA UMR1391 Interactions Sol Plante Atmosphère (ISPA),
F-33140, Villenave d'Ornon, France.

³ Université de Bordeaux, ISVV, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE),
Bordeaux Sciences Agro, F-33140, Villenave d'Ornon, France.

⁴ Université de Bordeaux, ISVV, UR Œnologie, F-33140 Villenave d'Ornon, France.

⁵ SFR Condorcet FR CNRS 3417, Université de Reims Champagne-Ardenne, Résistance
Induite et Bioprotection des Plantes (RIBP) EA 4707, BP 1039, Reims, Cedex 2 51687,
France.

Address for correspondence: Prof. Patrice Rey, Bordeaux Sciences Agro, UMR1065 Santé
et Agroécologie du Vignoble, F-33140, Villenave d'Ornon, France. E-mail:

patrice.rey@inra.fr

Keywords: Esca; gene expression; grapevine; physiology; sap flow; stomatal activity

I. INTRODUCTION

The vascular system is at the central core of the plant life and disruption in its functioning affects, temporally or irreversibly, the plant health. This disruption may result from various factors such as occlusion of the vessels, e.g. via air-embolism, tyloses, or destruction of the vessels, e.g. by microbial pathogens. Depending on the level of water and mineral nutrients hindrances within the vascular system, sap flow disorders generally result the plant to be partially or totally withered. If we focus on the fungal pathogens, they are diverse and attack a broad range of plants causing external and internal symptoms. External symptoms are generally associated with leaf necroses as atypical colors appeared due to leaf physiological changes [1]. Internal symptoms imply specific vessels damage but woody tissues destructions that attain the vessels and hamper sap flow may also be seen [2].

Among the plant diseases that affect the vascular system, Esca of grapevine (*Vitis vinifera* L.) is one of the most damaging and difficult diseases to control in many vineyards worldwide, including in Europe (e.g. France, Italy, Portugal, Spain) [3,4], North (e.g. California) and South (e.g. Brazil, Chile) America, Asia (e.g. Israel) and Africa (e.g. South Africa, Tunisia) [5]. This Grapevine Trunk Disease (GTD) induces high economic losses due sudden grapevine death but, in many cases, the pathological process lasts several years. During this long period, typical external symptoms appear in the form of “tiger-striped” leaves on infected plants [6]. To complicate the Esca-diagnosis of grapevines, these foliar symptoms are sometimes erratic from one year to another. In short, for Esca as for many diseases, external symptoms are the consequences of internal symptoms that sometimes appeared very long before. For Esca, it is remarkable that various wood necroses are always observed in diseased-grapevines and, their initial formation certainly began years before the leaf symptoms appearance [6,7]. In the most severe form of the disease, complete drying of the vine can occur within a few days, leading the plant to an apoplectic state.

The hydraulic failure of Esca leaf symptoms has recently been reported by Bortolami *et al.* (2019) [8] and they mentioned that two Esca-vascular pathogens, *Phaemoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium minimum*, were not found in leaves although occlusions, due to tyloses and gels, were observed. If we look at the source of the diseases, i.e. the wood decay, it has been frequently reported that tracheomycotic agents such as *P.*

chlamydospora [9–11], multiple *Phaeoacremonium* species [9,10,12,13] and basidiomycetes species, such as *Fomitiporia mediterranea*, are responsible of necroses formation in woody tissues [9,14,15]. All these pathogens have been isolated from the woody tissues of perennial organs [16] and are able to cause wood necroses when inoculated to vines [17]. Up to date, studying the link between the extents of necroses within the plant, foliar symptoms and hydraulic failure in the trunk and cordon vessels have been rarely investigated. Recently, vascular dysfunction in Esca-symptomatic grapevines was measured using heat-sensor probes, based on Granier's design [18], and inserted directly in the trunk of the vines. This experimental approach showed that the maximum transpiration of vines expressing Esca-foliar symptoms was, on average, 30% lower compared to healthy control vines [2]. For the first time, this preliminary experiment showed that sap flow is hampered in plants having a high level of necroses, especially the white-rot necrosis, even one week before the Esca-foliar symptoms appearance [2]. Based on this first result, deciphering the inner changes occurring in Esca-diseased vines vs healthy seems to be of relevant importance. It means deciphering the link between wood necroses and consequences on key physiological parameters such as sap flow, stomatal conductance and primary metabolism. Questions on the link between trunk water transport and leaf stomatal regulation of transpiration remain unresolved, partly due to the lag between water absorption and water loss. Another key point is to understand the relationship between inner destructions in the wood of both trunk or cordon and grapevine physiology prior any external visible Esca-leaf symptoms appeared. Previous reports showed that early physiological alterations such as dysfunctions of the photosynthetic apparatus, induction of defense mechanism and accumulation or alteration of phenolic compounds, were observed one week before Esca-leaf symptoms appeared [19,20]. However, studying the link between internal and external symptoms, i.e. between wood necroses, vascular system functioning and leaf physiology, by taking them into account at the same time has not been yet investigated.

In this study, we thus analyzed, over a two-year period and across the main phenological stages of the grapevines, some key ecophysiological functions to estimate changes in hydraulic parameters that describe the whole-plant conductance loss in response to Esca infection. First, we observed the extent and type of wood necrosis, in the trunk and cordons of healthy and symptomatic grapevines that had been physiologically monitored for 2 years. All these grapevines were planted in a vineyard whose plants have been monitored

for Esca since the beginning of its plantation, 16 year-ago. Secondly, we analyzed the operating efficiency of sap conducting vessels with vine-adapted thermal sensors placed directly around small and young (one-year-old) stems from healthy and Esca-diseased grapevines. This heat balance method used to measure sap flow does not require the intrusion of a needle shaped probe and thus maintains the integrity of the hydraulic system intact. In addition, as the entire stem section is heated, the heat balance method can be applied even if sap flow trajectory through the stem is tortuous. Other leaf-related physiological parameters such as stomatal conductance, nitrogen balance index (NBI), phenolic compounds and the expression of specific primary metabolism genes were also measured. By associating internal and external Esca-symptoms in the same study, specific physiological changes will be pointed out in Esca-symptomatic grapevines in comparison to healthy ones.

II. MATERIALS AND METHODS

II.1. Plant material

Bordeaux Sciences Agro, the owner of the Château Luchey-Halde vineyard (Mérignac, Bordeaux region, France, latitude: 44.8218, longitude: -0.6291), gave permission to conduct the study. No specific permissions were required for these research activities since Bordeaux Sciences Agro promotes this type of experimental project. The field studies did not involve endangered or protected species.

In the Château Luchey-Halde vineyard, the study was conducted on 17-year-old Cabernet Sauvignon grapevines (*Vitis vinifera* L.), grafted on 10 114 MG rootstock and planted in a sandy clay soil at a density of 8000 vines/ha. The vines were pruned using a double Guyot training system and the canopy was trimmed at 120-130 cm high and 50–60 cm wide. The experimental plot was chosen because of the high Esca incidence and because it has been surveyed for the presence of Esca-foliar symptoms since its plantation in 2000. Only grapevines that had previously expressed Esca-foliar symptoms at least twice over a period of 3 years between 2014 and 2016 were considered symptomatic. The control plants never expressed the foliar symptoms. In order to acquire qualitative and quantitative

characterizations of the physiological disruptions caused by Esca, 16 asymptomatic and 16 foliar-symptomatic grapevines, without variability in terms of vigour, were selected. Vines in the experimental plot were classified in the following categories: S = symptomatic vines with pronounced symptoms related to 20-100 % disease severity; and A = asymptomatic vines that never showed foliar symptoms in the previous years. Vines that had showed symptoms in the previous years but did not maintained a continuous Esca-foliar expression throughout the monitoring period were discarded from the analysis. The vines that showed less than 20% disease severity were not included in the S category because the symptoms were generally located in basal leaves, which have low impact on yield quality and quantity.

The survey was conducted over a 2-year period in 2017 and 2018, from fruit setting to berry ripening. During the monitoring period, several leaf-level physiological parameters were measured including the stomatal conductance, the leaf nitrogen content (NBI), the phenolic activity, and the leaf area index (LAI). Experiments were conducted on both symptomatic and asymptomatic leaves for diseased plants. Whole-plant water transport (stem sap flow) was continuously recorded in 12 grapevines, composed of 6 control (A) and 6 Esca-diseased plants (S), by installing sap flow heat sensors around the stem. Phenological observations were performed weekly, based on the international BBCH scale (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und Chemische Industrie) [21]. In 2017, the physiological monitoring of grapevines was carried out between July 2nd at the phenological stage 77 on the BBCH scale (bunch closure) and September 17th (harvest). The first Esca-foliar symptoms were observed on July 19th at stage 83 (mid-veraison). In 2018, the physiological monitoring was carried out between June 10th at the phenological stage 69 on the BBCH scale (End of flowering) and September 17th (harvest). The first Esca-foliar symptoms were observed on July 12th at stage 77 (bunch closure).

In order to follow the evolution of the physiological response in Esca-diseased grapevine to the onset of foliar symptoms, Esca notations were performed on the 32 monitored grapevines, whenever leaf level measurements were carried out. The prevalence of Esca-foliar symptoms was calculated at the end of each year, when all symptomatic grapevines had expressed foliar symptoms. The prevalence of Esca-foliar symptoms corresponds to the ratio between the numbers of grapevines that expressed Esca-foliar symptoms at the time of the notation and the total number of Esca-symptomatic grapevines.

Climate was characterized with agrometeorological data acquired from a weather station, located on a neighbouring plot, less than 200 m from the monitored grapevines. Air temperature, relative humidity (RH), photosynthetic active radiation (PAR), vapour-pressure deficit (VPD) and rainfall were recorded by the weather station on a daily basis.

II.2. Leaf-level physiological parameters

II.2.1. Stomatal conductance (g_s)

Measurements of stomatal conductance (g_s) were carried out with a Li-Cor 1600 steady state porometer (Li-Cor Corp., Lincoln, NE, USA) on each of the 32 monitored grapevines. Only sun-exposed and recently fully expanded leaves were measured, with a minimum of two replicates per cordon. No. 5 and no. 7 leaves counted from the top of the shoots were systematically measured. The first leaf having a central vein longer than 3 cm was considered as leaf no. 1. The measurements were conducted twice a week between 10:00 a.m. and 12:00 a.m. when g_s reached maximum values. As soon as Esca-foliar symptoms were noticed, the measurements were performed every two days. However, because of the high frequency of phytosanitary treatments that occurred in the vineyard, which is common at the vegetative period in the Bordeaux wine region, a total of 11 and 14 days of measurements were possibly achieved in 2017 and 2018 respectively.

II.3. Dualex measurements

The Dualex 4 Scientific (Force-A, Orsay, France) was used to monitor grapevine leaf nitrogen status and assess leaf phenolic compounds. The Dualex technology is based on chlorophyll fluorescence excitation screening by UV-absorbing compounds of the epidermis as described by Goulas *et al.* (2004) [22]. The Dualex leaf-clip measured four optical indices: chlorophyll (Chl), epidermal flavonols (Flav), nitrogen balance index (NBI) that is the ratio

of the two former indices, and epidermal anthocyanin (Anth). The data collected were used as given by the device, as it was calibrated in $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ units. Dualex measurements were systematically performed following porometer recordings, between 12:00 a.m. and 01:00 p.m. on the same no. 5 and no. 7 leaves on which gs was measured.

II.3.1. Leaf area index (LAI)

The Leaf Area Index (LAI) was estimated for each monitoring season using Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) measurements. The experimental plot was mapped by Fruition Sciences (Bordeaux – France), through high-resolution aerial imagery acquisition. Each year, two plane-flight campaigns were performed to determine individual NDVI values of grapevines equipped with sap flow sensors, using a spatial resolution of 10 cm ground sampling distance. The first flight was carried out in June at stage 75 (berries pea-sized), when no Esca-foliar symptoms had yet appeared on infected grapevines. A second flight was performed in August at stage 83-89 (berry ripening) when the prevalence of Esca-symptoms reached 80% and most foliar discolorations had been expressed. The QGIS software [23] was used to georeference grapevines equipped with sap flow sensors and extract their individual NDVI values through image processing. Leaf area index was calculated as follows using the linear relationship between NDVI and vine LAI described by Johnson (2003) [24].

II.4. Sap flow monitoring

The first day of sap flow measurement started July 9th, 2017 at the beginning of veraison (stage 81 on the BBCH scale). Sap flow (F , $\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$) was measured on twelve selected grapevines including 6 Esca-diseased and 6 control plants. In 2018, sap flow sensors were installed under the same conditions, starting June 19th at stage 75 on the BBCH scale (berries pea-sized). During both years, sensors were maintained on grapevines until harvest (September) and thus followed the progressive development of Esca-foliar symptoms. A total of six measurement sites were installed in the experimental plot. On each site, two

grapevines, one healthy and one infected by Esca, located in the same row and distant from a maximum of 10 meters, were equipped with sap flow sensors. Heat sensors of 10 mm diameter (Dynamax, Inc., Houston, TX, USA) were provided by Fruition Sciences and installed, on one vine cordon corresponding to the wood of the year n-2, to avoid irregular basal trunks or ground temperature gradient effects.

Dynamax sap flow sensors design consists of a heating sleeve wrapped around the grapevine stem. The sleeve flexibility ensured a snug fit on every stem section and enabled sap-flow sensors to provide heat uniformly and radially across the inner wood. Thermal grease was used to optimize contact between the sensor and the wood, before applying thermal and waterproof protection around the sensors. In addition, trunk, cordons and stems were wrapped with reflective insulation using an aluminium sheath, to minimize direct solar irradiance. Maintenance operations were performed every two weeks to assess the status of the whole installation, and prevent any damages that could be caused by a continual application of heat under low flow rates conditions. The signals emitted from the sap flow sensors were scanned every 30 s, and the data computed and stored in SAPIP data loggers (Dynamax, Inc., Houston, TX, USA) corresponded to 15 min averages. Arduino open-source microcontroller boards, equipped with a data logger shield, were connected to the SAPIP to send the data collected by sap flow sensors directly to Fruition Sciences servers and perform real-time assessments of the measurement quality on each site. Coolterm software was used to store the sensor output data in text file format. An autonomous power supply system, consisting of a 12 V slow-cycle battery (Eversol, 90 Ah) a 50 W solar panel and a charge regulator (Steca solsum, 6 A), was used to continuously supply the sensors, the SAPIP data loggers and the arduinos.

The sap flow rate (F) was calculated using the stem heat balance (SHB) method. The continual heat applied to the stems enables measurement of F by monitoring the stem's thermal regime. This method involves solving the heat balance over a stem section by applying constant or variable power to continuously heat the tissue [25–27]. In our study, a constant power of 2 W was applied to each sensor, and temperature gradients (ΔT) were measured by three thermocouples mounted within the heat sensor. The thermocouples, continuously measured the variations in temperature differences from the heater strip to the stem, the ambient and into the sap flow. The mass flow of sap (F, g.h⁻¹) was then computed

by determining, by difference, the amount of heat transported in the moving sap. The temperature of the heating sensor, maximum when the value of the sap flow is zero, decreases as the sap velocity grows, an increasing amount of heat being evacuated by convection.

The SAPIP system used in the experiment recorded the signals and calculated the sap flow (F) with a well-accepted energy balance formula, as described by Baker and Van Bavel (1987) [25]. Sap flow measurements were then scaled at the plant level using the leaf area index (LAI) to convert mass sap flow (F) to whole-plant evapotranspiration (ET).

Finally, the stand grapevine density, ET was scaled and converted to a plot scale average transpiration per unit ground area and per day (TP, in mm.d⁻¹ corresponding to kg.m⁻².d⁻¹). From one day to the next, variations in the water content of the aerial part of grapevines are generally neglected as water storage compartment are refilled at night [28] and the daily TP was assimilated to the total sap flow cumulated over 24 hours as described by Domec *et al.* (2009) [29].

II.5. Necroses image-analyses

Once the physiological monitoring period was achieved (September 2018), grapevines equipped with sap flow sensors were uprooted and cut longitudinally. One half of each trunk was then photographed for quantification of necrotic wood, which was, in comparison to apparently healthy wood, darker brown in colour and varied in texture from hard (necrotic-tissue) to soft and spongy (white-rot). The severity of each necrotic area was assessed from the photographs using the image-analysis software ImageJ (NIH, USA; <https://imagej.nih.gov/ij/>), and necroses were evaluated according to the percentage of trunk area infected as described by Liminiana *et al.* (2009) [30].

II.6. Gene expression

II.6.1. RNA extraction

Among grapevines equipped with heat sensors, four Esca-diseased and four control plants had their leaves sampled five times throughout the 2018 growing season, to further investigate the expression of genes involved in physiological dysfunctions caused by Esca. Care was taken to only sample leaves from the same height of the canopy at which both stomatal activity recordings and Dualex measurements were made. For each sampling time, healthy, sun exposed and fully expanded leaves were collected from the medial part of each cordon, for both control and Esca-diseased grapevines. With regards to the BBCH scale, leaf samples were collected two times at stage 75 (berries pea-sized) corresponding to T0 and T1 when few Esca-foliar symptoms were visible; one time at stage 77 (bunch closure) corresponding to T2 when the prevalence of Esca-foliar symptoms attained 20%; two times at stage 85 (veraison) corresponding to T3 and T4, when the prevalence of Esca-foliar symptoms reached 80%. Among the four Esca-diseased grapevines that were sampled, two plants continuously expressed Esca-foliar symptoms during the season. Starting on T1, a total of four symptomatic leaves were collected during each sampling phase. Specifically, leaves collected from each sampled vine, were immediately frozen in liquid nitrogen then stored at -80°C . RNA extraction was performed according to the protocol described by Reid *et al.* (2006) [31]. A total of 20 samples were extracted for each modality (Esca-diseased and control). For symptomatic leaves, a total of 10 samples were extracted and their analysis was performed in comparison with the healthy leaves collected on the same symptomatic grapevines.

The leaves were ground in liquid nitrogen to a fine powder using a pestle and mortar. The leaf powder was then added to an extraction buffer (20 g.ml⁻¹) preheated to 56 °C (300 mM Tris HCl, pH 8.0, 25 mM EDTA, 2 mM NaCl 2% CTAB, 2% polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), 0.05% spermidine trihydrochloride and 2% β -mercaptoethanol added ex-temporaneously). The mixture was stirred vigorously and incubated in a water bath at 56 °C for 10 min under regular stirring. An equal volume of chloroform: isoamyl alcohol (24:2, v/v) was added and then centrifuged at 3500 g for 15 min at 4 °C. The following RNA extraction steps were conducted using the Spectrum™ Plant Total RNA Kit protocol: RNA

was captured onto a binding column using a unique binding solution, which effectively prevents polysaccharides as well as genomic DNA from clogging the column. Residual impurities and the most residual genomic DNA were removed by DNase treatment according to the manufacturer's procedure and with wash solutions. Purified RNAs were eluted in RNase-free water. The amount of RNA obtained was measured at 260 nm and 280 nm by spectrometry (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, France). RNA integrity was assessed by electrophoresis on an agarose gel and by passage over a Bioanalyzer (Agilent technology, France).

II.6.2. Real-time RT-qPCR analysis

Total RNAs (150 ng) were reverse-transcribed using verso cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's protocol. Real-time polymerase reaction (PCR) was performed using Absolute Blue qPCR SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), in a CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The thermal profile was 10 s at 95°C (denaturation) and 45 s at 60°C (annealing/extension) for 40 cycles. The specificity of PCR amplification was checked using a heat dissociation curve from 65 to 95°C following the final cycle. PCR efficiency of the primer sets was calculated by performing real-time PCR on serial dilutions of cDNA. For each experiment, PCR reactions were performed in duplicate, and two independent experiments were analyzed. For each gene and for each modality, a mean Cq value was obtained. The Cq values > 30 were regarded as invalid and treated as missing data. Results were normalized with two reference genes (EF1- α and 60SRP, Table 1), and relative gene expression (RE) was determined with the 2- $\Delta\Delta$ Cq method as described by Livak and Schmittgen (2001) [32], using CFX Manager 3.0 software. For every sample $\Delta\Delta$ Cq was the Δ Cq difference between two samples. Expression of genes encoding enzymes involved in the carbohydrate metabolism (α A, β A, SucS2), the photosynthesis activities (RbcL, SBP, psbP1), the photosynthetic electron transport (Fd), the plant defense mechanism (PR6) and the stress response system (HSP- α , PIP2.2) was tracked by quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) using the primers listed in Table S1.

II.7. Statistical analysis

Statistical analyses were performed in R software [33]. In order to determine whether or not our variables of interest were different according to the health status of the grapevines, analyses of variance (ANOVA) were performed for each physiological parameter. The normality of the residuals of the variables was tested using the Schapiro-Wilk test. When the validation tests were not significant, a non-parametric test was used (Kruskal-Wallis). The tests were taken as significant when $p < 0.05$.

III. RESULTS

III.1. Climatic context

The 2017 vintage was marked by a cold and dry winter until January then by a mild and rainy weather in February and March, which lead to an early budburst. Two successive episodes of frost at the end of April affected a small portion of the experimental plot, but did not damage the grapevines selected for the physiological survey. Nevertheless a phenological delay was recorded due to the low temperatures in the beginning of the growing season (Figs 1B, 1C). The summer of 2017 was exceptionally dry, but did not caused water stress, especially on account of the major rain event of June when grapevines achieved bunch closure (Fig 1D). In comparison, 2018 was a rather wetter year, as the cumulated winter rain between November 1st and March 1st was about 385 mm compare to 200mm in 2017 (Fig 1C).

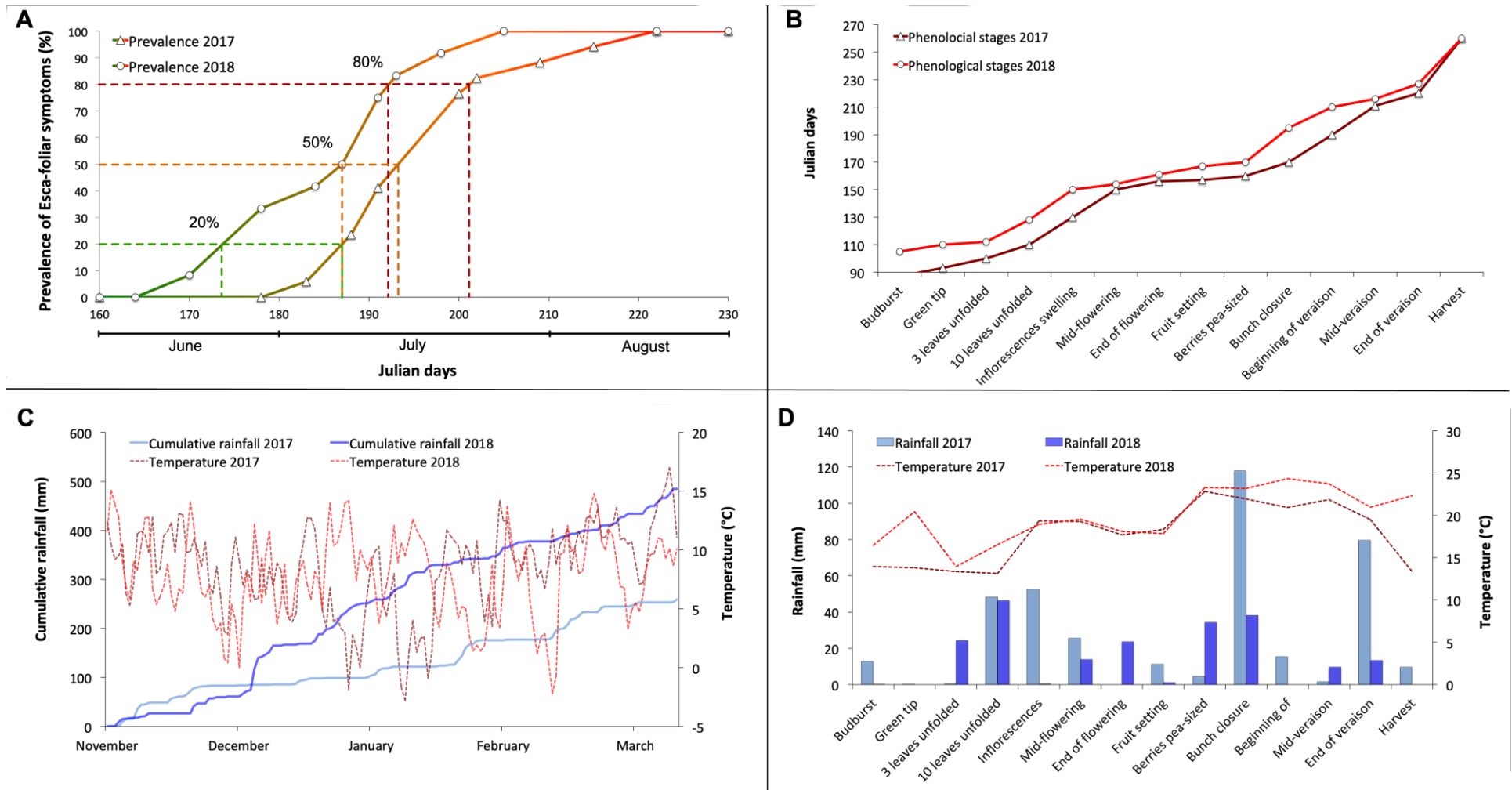


Figure 1: Characterization of the sanitary, phenological and climatic context of the 2-year physiological monitoring period
 (A) Evolution of the prevalence of Esca-foliar symptoms in 2017 and 2018. (B) Chronology of the main phenological stages in 2017 and 2018. (C) Comparison of winter cumulative rainfall and temperatures during the 2017 and 2018 winter season, and (D) Comparison of rainfalls and temperatures during the 2017 and 2018 growing season.

III.1.1. Esca-foliar symptoms and necrotic wood ratio

During the 2-year physiological monitoring, field notations were performed on the 16 Esca-symptomatic grapevines (S1 to S16) and the 16-asymptomatic control plants (A1 to A16) to assess the presence of Esca-foliar symptoms (Table S2). Out of the 32 surveyed grapevines, changes in symptoms expression occurred on 8 plants. Control plants that contracted the Esca form, and Esca-diseased grapevines that did not continuously express Esca-foliar symptoms, during the monitoring period, were discarded from the following results. It should be noted that the frequency of appearance of foliar symptoms from one year to another seems to increase proportionally with the risk of apoplexy. In total, among the 16 symptomatic grapevines that were monitored, three had died by apoplexy at the end of the experiment.

The evolution of prevalence in 2017 and 2018 is presented in Fig. 1A. Three thresholds were used to follow the progressive development of Esca-foliar symptoms, 20% corresponds to the beginning of Esca-foliar expression, 50% corresponds to the date when half symptomatic grapevines had expressed foliar symptoms, and 80 % corresponds to the time when most of the grapevines had expressed symptoms. The grape cycle dynamic was similar during both growing seasons i.e. the succession of the main phenological stages was consistent between 2017 and 2018, as shown in Fig. 1B. As a matter of fact, for both years, most Esca-foliar symptoms appeared during berry-ripening as the prevalence of Esca-foliar symptoms reached 80% at day of the year (DOY) 193 in 2018 and at DOY 202 in 2017 (Fig. 1A).

When looking at the whole grapevine, trunk and cordons combined, larger amounts of necrotic-wood including white rot were found inside grapevines that expressed Esca-foliar symptoms (Fig. 2). In symptomatic plants, white rot ratios consistently accounted for 15% to 50% of the total necrotic area regardless of the tissue considered. In asymptomatic grapevines, the necrotic-wood ratio remained low with less than 30% of the total wood

surface being necrotic, and with a negligible proportion of white rot. Among the control plants, A2 and A4 expressed Esca-foliar symptoms in 2017 and 2018 respectively (Table 2). Both contaminated grapevines had a total necrotic-wood ratio close to the other asymptomatic grapevines. However, traces of white rot were found in their trunk and cordons. The proportion of white-rot in A2 and A4, accounting for less than 10% of the total wood surface and remained significantly lower when compared to other symptomatic grapevines (Fig. 2).

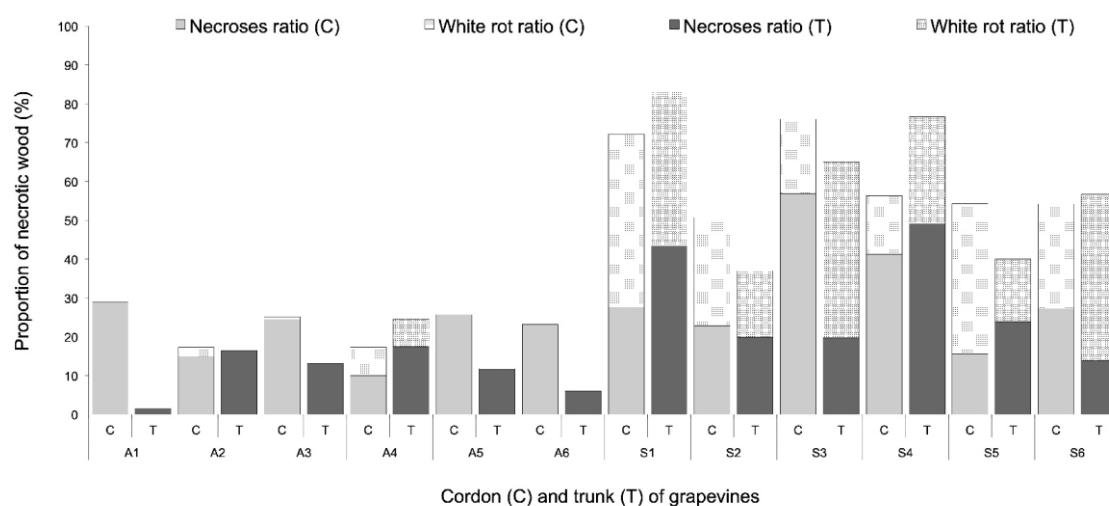


Figure 2: Percentage of necrosis and white rot in the trunk wood (T) and cordons (C) of asymptomatic (A) and symptomatic (S) Cabernet Sauvignon grapevines.

III.1.2. Average grapevine water use and transpiration

Data collected during the 2-year monitoring were summed up for each 7-day period and are presented in Figure 3, where histograms show the cumulative water use per week recorded in healthy and Esca-symptomatic grapevines.

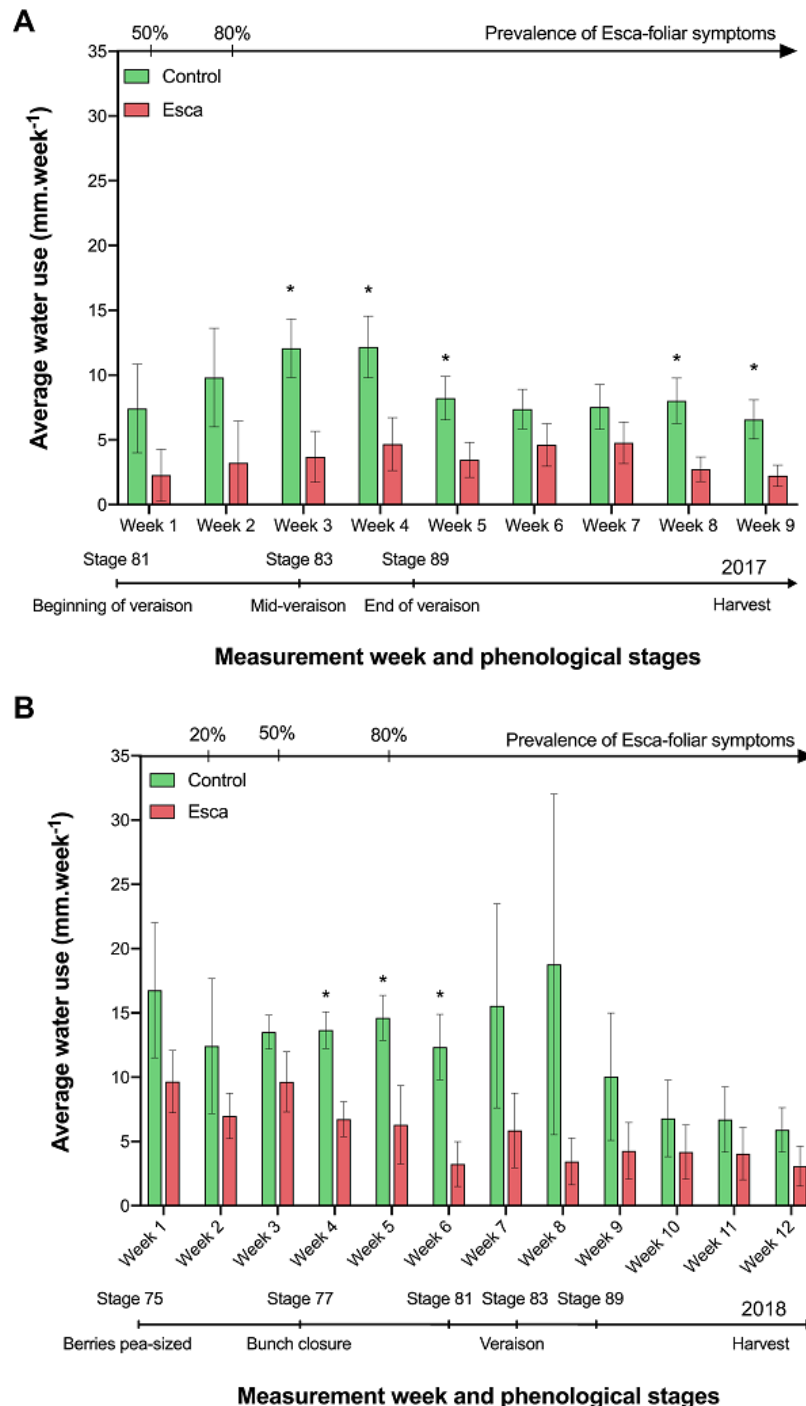


Figure 3: Evolution of grapevine water use in control and Esca-symptomatic Cabernet Sauvignon grapevines. Comparison of the average grapevine water use between Esca-diseased and control grapevines in 2017 (A) and in 2018 (B). Error bars represent SE. Stars (*) indicate a significant difference (at $p < 0.05$) in water use for a given week between asymptomatic and symptomatic grapevines.

In 2017, the water use of healthy plants was significantly higher compared to plants that expressed Esca-foliar symptoms (Fig. 3A). Although the same trend remained over the entire monitoring period, significant differences were measured between mid-veraison (stage 83) and harvest. The average water use in symptomatic plants became 2 to 3 times lower compared to controls. For example, at mid-veraison (week 3), the average water use in healthy plants was 12 mm.week⁻¹ versus 4 mm.week⁻¹ for diseased plants, which corresponded to a water use of about 2.14 L.d⁻¹ for healthy vines against 0.71 L.d⁻¹ for vines that expressed Esca-foliar symptoms. Similar trends were recorded in 2018 (Fig. 3B), but significant differences were measured earlier in the season, between bunch closure (stage 77) and the beginning of ripening (stage 81).

In 2017, the data selected to analyse the variation of sap flow were acquired continuously from stage 81 on the BBCH scale (beginning of veraison, i.e. mid July) to harvest. Temperatures did not exceed 27°C and the mean maximum daily Vapour-Pressure Deficit (VPD) remained around 2,5 kPa. In 2018, the data recording phase started at stage 75 (berries pea-sized i.e. mid June) and was marked by higher temperatures and VPD values which lead to a higher evaporative demand compared to 2017. Sap flow reached a mid-day plateau which was maintained for about 6 hours between 10:00 a.m. and 04:00 p.m. Sap flux density increased shortly after sunrise, reached a peak by 2:00 p.m. and decreased in the late afternoon (Figs. S1 A and B). No significant correlation ($R^2 < 0,31$) could be established between rainfall, temperature or the VPD and the average daily or weekly water use of grapevines, in relation to their health status (data not shown).

Regardless of the prevalence of Esca-foliar symptoms, the analysis of transpiration dynamics according to the health status of grapevines, revealed two distinct kinetics. Although hourly transpiration recorded in Esca-diseased and control grapevines show a similar evolution, the average maximum transpiration (measured around midday periods when light was not limited) in grapevines that started to develop Esca-foliar symptoms was significantly lower ($p < 0.05$) than in controls (Fig 4A).

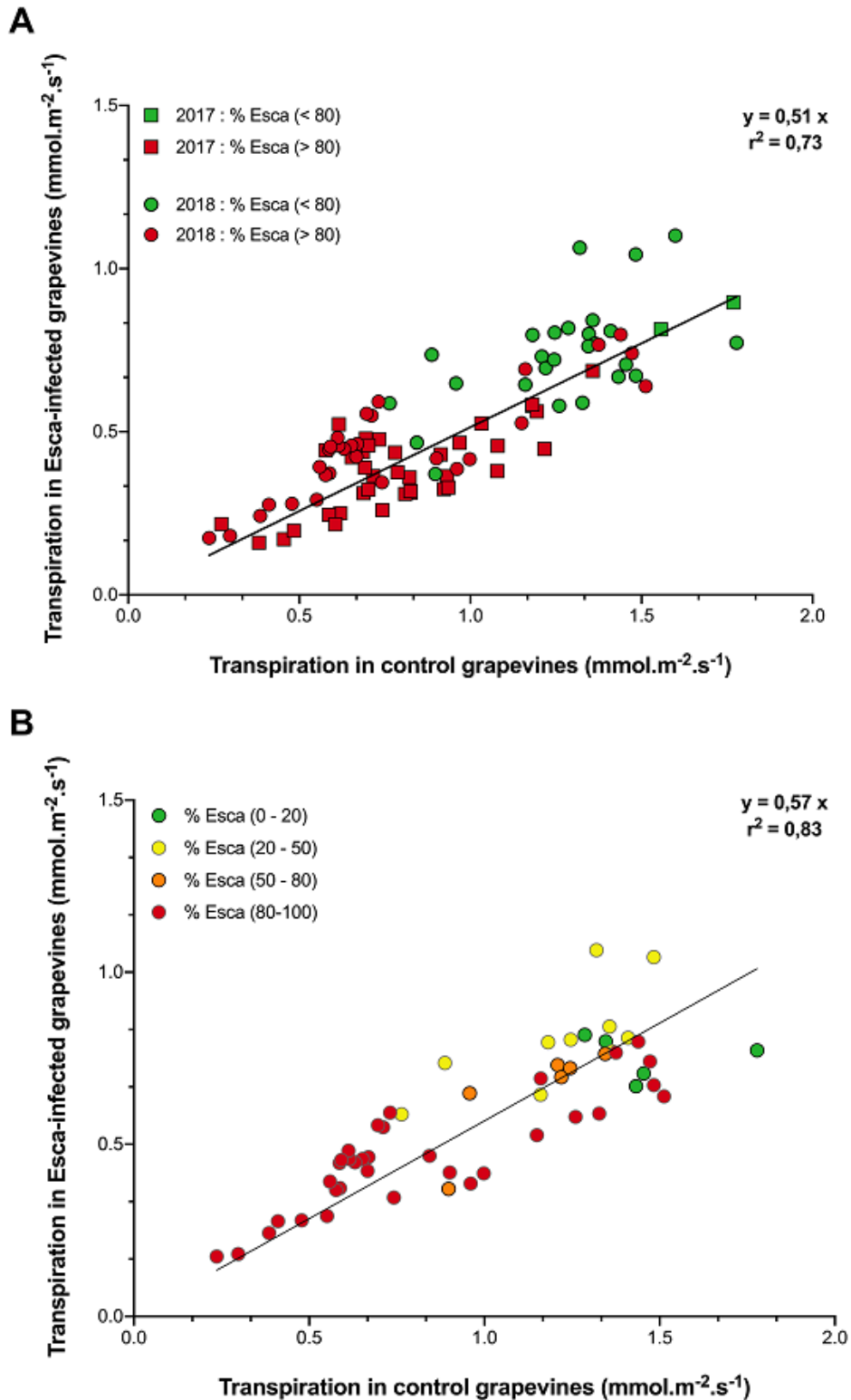


Figure 4: Comparison of whole plant transpiration in asymptomatic and symptomatic Cabernet Sauvignon grapevines. Data represent transpiration values under non-limited light conditions, i.e. recorded between 10:00 a.m. and 4:00 p.m. (A) Mean daily transpiration in asymptomatic and symptomatic grapevines. Data were separated to reflect days “before” (green symbols) and “after” (red symbols) prevalence of Esca-foliar symptoms reached 80%, in 2017 (squares) and 2018 (circles). (B) Mean daily transpiration in asymptomatic and symptomatic grapevines. Data were separated to reflect days with different prevalence levels of Esca symptoms, 0-20% (green symbols) 20-50% (yellow symbols) 50-80% (orange symbols) and 80-100% (red symbols) in 2018.

To better estimate the water balance in both S and A plants, the leaf area index of each grapevine was considered to calculate the daily transpiration (Fig. 4). On average, the transpiration ranged from 0.2 to 1.7 mmol.m⁻².s⁻¹ i.e. 0.3 to 2.7 mm per day. The daily transpiration recorded in S grapevines was about 40 to 50% lower than in healthy plants (p<0.001). This downward trend remained the same before and after the expression of the foliar Esca symptoms (Fig. 4B).

III.1.3. Leaf stomatal conductance, photosynthesis and phenolic activity

Both in 2017 and 2018, when grapevines had not yet expressed any leaf symptoms, no conclusive and consistent differences in stomatal conductance (gs) were recorded. However, when the prevalence of Esca-foliar symptoms reached 50 to 80%, corresponding to stage 81 on the BBCH scale for 2017 and stage 75 for 2018, the average gs dropped significantly in Esca-diseased grapevines compared to control plants. Both years, the average gs measured on the leaves that progressively became symptomatic during veraison, was on average, 1.5 times lower than in control leaves (Fig 5). When the prevalence of Esca-foliar symptoms reached 80%, and most of Esca-foliar symptoms had appeared, gs on symptomatic leaves rarely exceeded 200 mmol.m⁻².s⁻¹, while gs in control leaves remained around 300 mmol.m⁻².s⁻¹. After stage 83 (mid-veraison), Esca-diseased leaves started to significantly dry and curl, preventing accurate measurement of gs. This difference was also recorded in the earlier stages, when the prevalence of Esca-foliar symptoms had just reached 20% and most leaves were in a pre-symptomatic state. The gs measured on control leaves were significantly higher than those measured on the pre-symptomatic ones, both at stage 81 in 2017 and at stage 75 in 2018 (p=0,05 and p=0,02 respectively; Fig. 5).

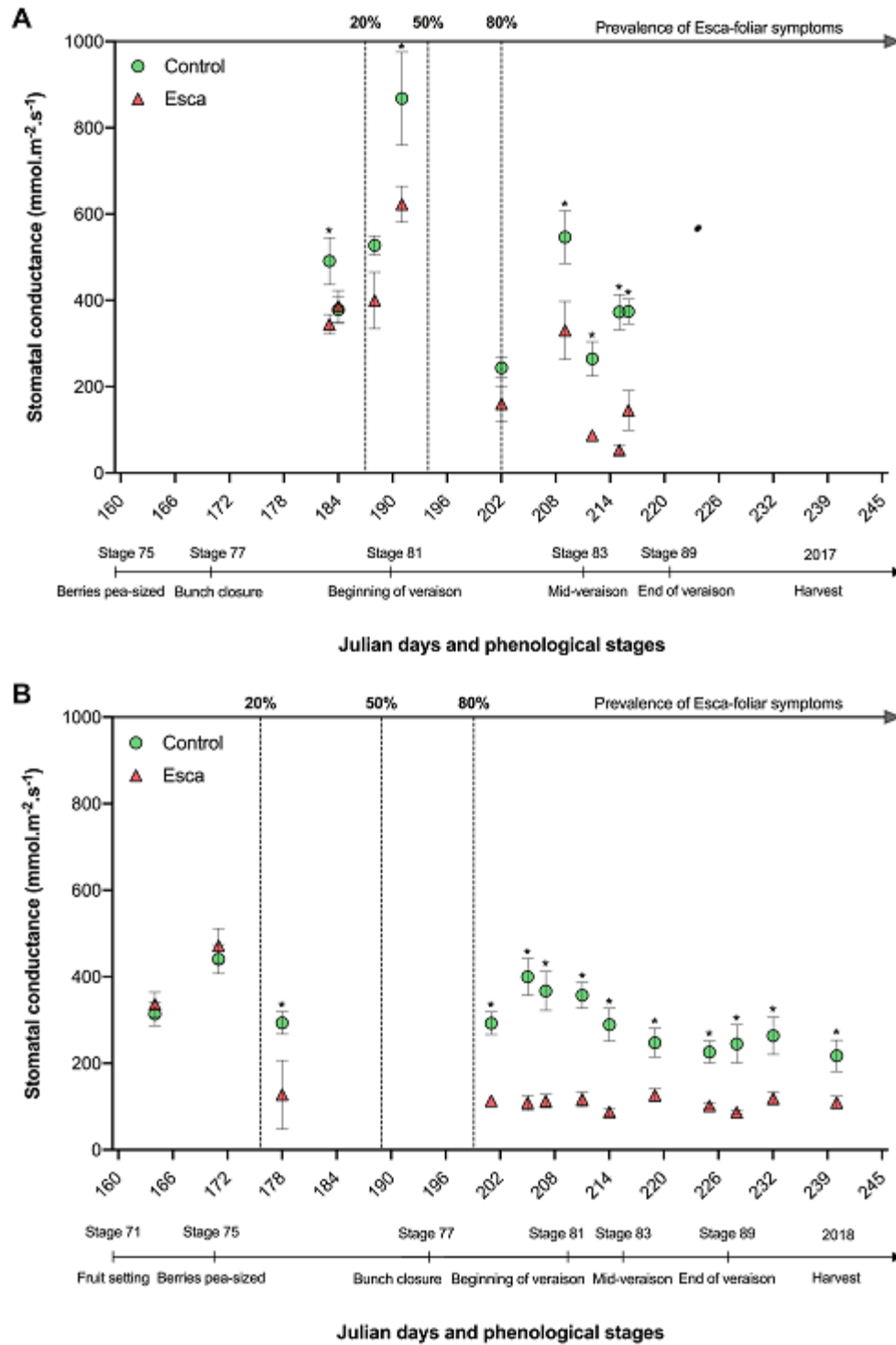


Figure 5: Evolution of stomatal conductance (g_s) in asymptomatic and symptomatic Cabernet Sauvignon grapevines.

(A) Average stomatal conductance in asymptomatic and symptomatic grapevines recorded in 2017. (B) Average stomatal conductance in asymptomatic and symptomatic grapevines recorded in 2018. Error bars represent SE and stars at a given date indicate a significant difference between asymptomatic and symptomatic grapevines at $p < 0,05$.

The responses of flavonols (Flav), chlorophyll (Chl) and of the Nitrogen Balance Index (NBI) content in Esca-symptomatic grapevines and control plants are presented in Fig. 6. There was no difference ($p>0.5$) in Flav content regardless of the year of measurement or the onset of Esca-foliar symptoms, between control and symptomatic leaves (Fig. 6A). However, Chl and NBI were significantly lower in symptomatic leaves when the prevalence of Esca-symptoms reached the 80% threshold; on average, once most symptoms had appeared on Esca-diseased grapevines, Chl and NBI measurements were 23% lower on symptomatic leaves compared to control ones (Figs. 6B, 6C). As Esca-foliar symptoms spread on symptomatic grapevines, chlorophyll activity was progressively altered, and photosynthetic functions are continuously degraded, even in the apparently healthy, green parts of symptomatic leaves. Regardless of the onset of Esca-foliar symptoms, the year of measurement had an effect on the level of expression of both Chl and NBI indices as data recorded in 2018 presented higher values compared to 2017 (Figs. 6B, 6C).

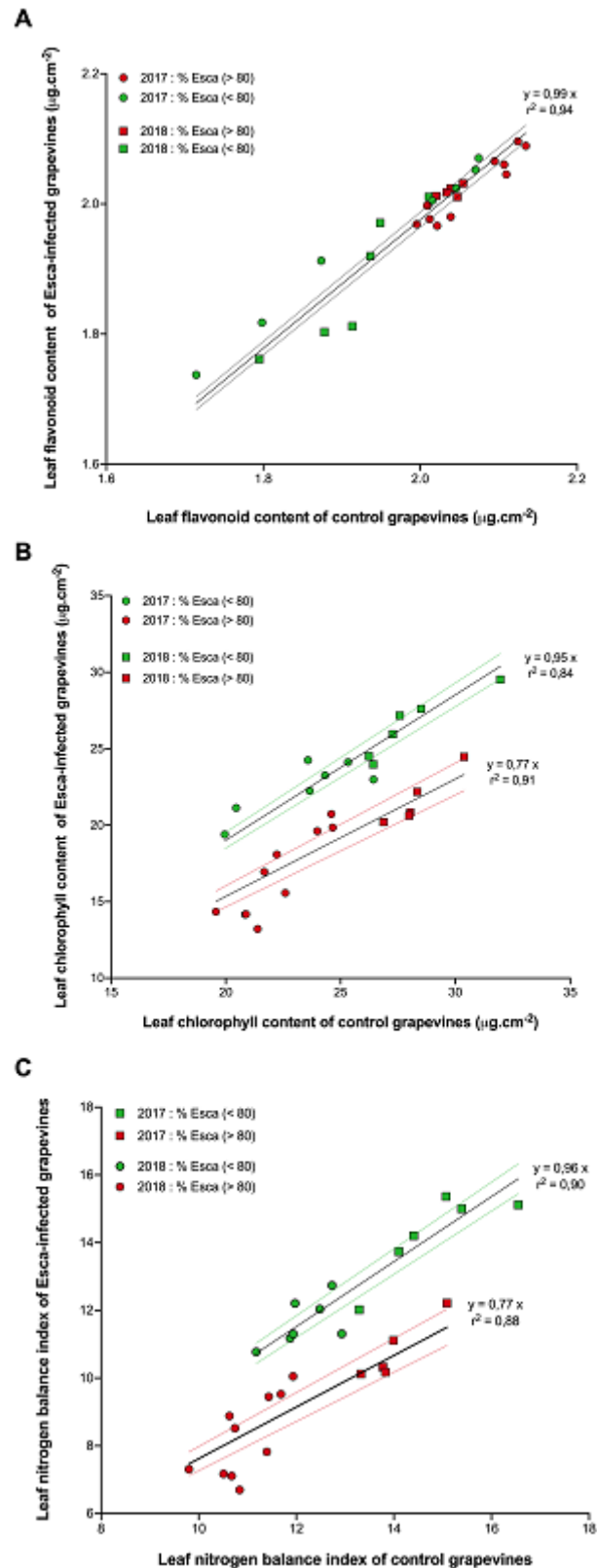


Figure 6: Responses of three optical indices in pre-symptomatic and Esca-symptomatic leaves in comparison with control (healthy) leaves.

Data represent the average of 64 leaves for each modality. Data were separated to reflect days “before” (green symbols) and “after” (red symbols) prevalence of Esca-foliar symptoms reached 80%, in 2017 (squares) and 2018 (circles). (A) Leaf flavonoid, (B) Chlorophyll content, and (C) leaf nitrogen index (derived from NBI). Regression models (full lines) and 95% confidence interval (colored dotted-lines) are also indicated.

Linear regression models were sufficient and were the best representation in all cases (Fig. 6). The evolution of anthocyanin (Anth) content in control and symptomatic leaves were consistent in 2017 and 2018 (Fig. 7). Once most Esca-foliar symptoms had appeared on infected grapevines, Anth content in symptomatic leaves was significantly higher compare to controls (Fig 7). In healthy leaves, values remained stable throughout the season. However, in symptomatic leaves, the Anth content during veraison seemed to increase especially in 2017 where values were twice as high as in control leaves (Fig. 7A).

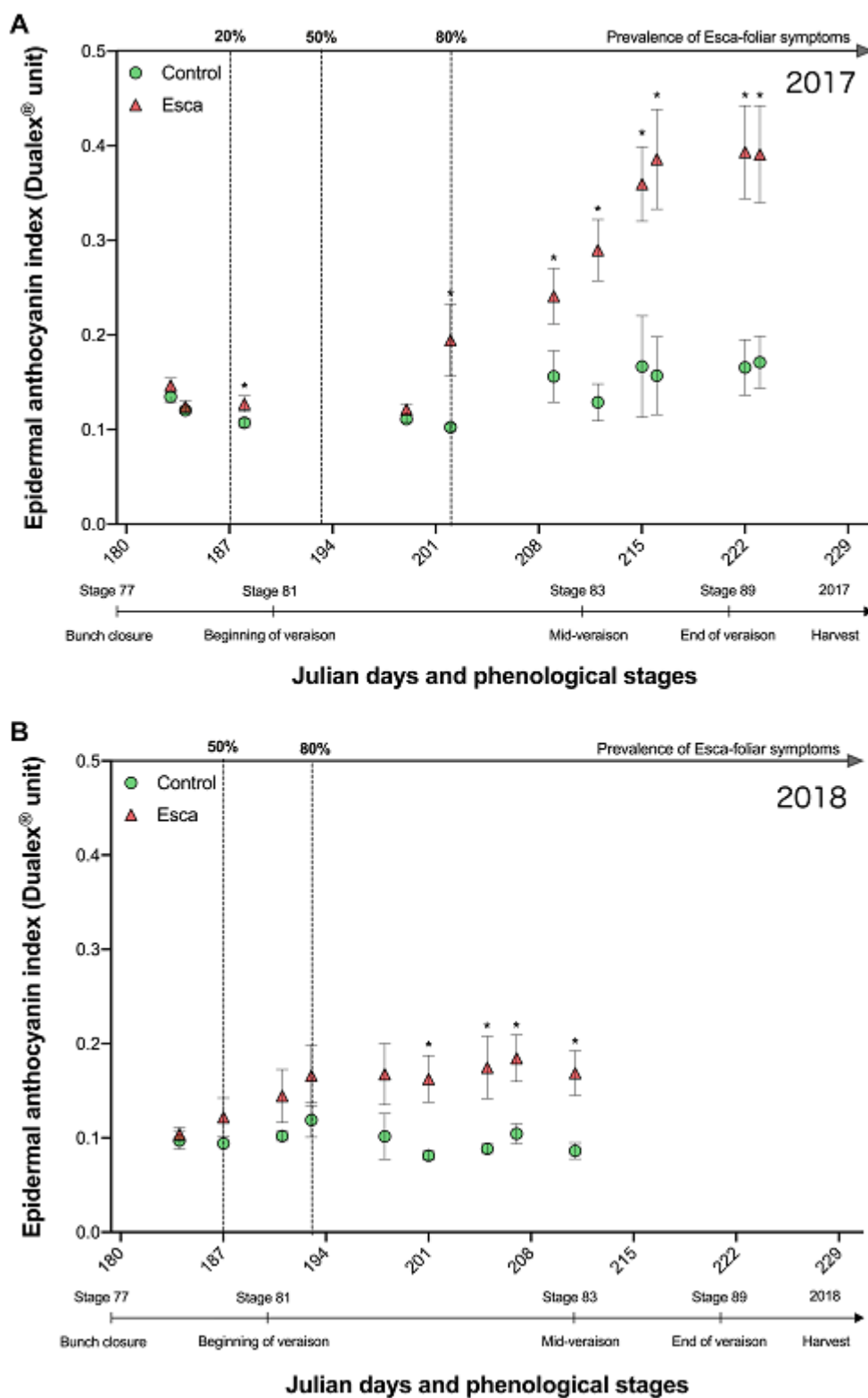


Figure 7: Responses of anthocyanins in in pre-symptomatic and Esca-symptomatic leaves in comparison with control leaves.

Average anthocyanin index in asymptomatic and symptomatic leaves measured in 2017 (A) and in 2018 (B). Error bars represent SE and a star for a given date indicates a significant difference between asymptomatic and symptomatic grapevines at $p < 0,05$.

III.1.4. RT-qPCR profiles of primary metabolism physiological functions

Esca emergence influenced leaf-level gene expressions regulating different physiological functions (Fig. 8). Those targeted genes involved in primary metabolism and physiological regulatory functions were expressed differently depending on the grapevine phenological stage and the presence or absence of Esca-foliar symptoms, at the time of the sampling. RT-qPCR profiles of genes involved in starch degradation, stress response and defense mechanism, showed a clear discrimination between healthy and symptomatic leaves. When the prevalence of Esca-foliar symptoms reached 20%, at stage 75, PR6 and Beta A were significantly up-regulated in symptomatic leaves. HSP- α was also up-regulated in symptomatic leaves, especially during veraison at stages 83 and 89 (Fig. 8A). The induction of genes involved in stress responses and defense mechanisms could be explained by the progressive spread of Esca-foliar symptoms on sampled leaves leading to severe disruption of photosynthetic related functions. As a matter of fact, the symptoms severity of sampled leaves gradually increased, each time leaves were collected for RT-qPCR analysis (Fig. 8B).

The principal component analysis (PCA) revealed that comparison between symptomatic and healthy leaves from Esca-diseased vines explained around 60% of the differences, whereas comparison between healthy leaves sampled on control plants or Esca-diseased grapevines, only accounted for 40% of observed differences (data not shown). Analysis of the gene expression profiles of Esca-diseased grapevines confirmed the strong down-regulation of photosynthesis-related genes (psbP1, Fd, RbcL, SBP) in symptomatic leaves during veraison (Fig. 9). Esca-symptomatic leaf samples collected during the previous phenological stages did not show a similar repression, despite the presence of some Esca-leaf discolorations. In addition, the expressions of genes involved in stress response (HSP- α) and defense mechanisms in response to pathogen infection (PR6) were also up-regulated once the 80% threshold of Esca-foliar symptoms prevalence was reached.

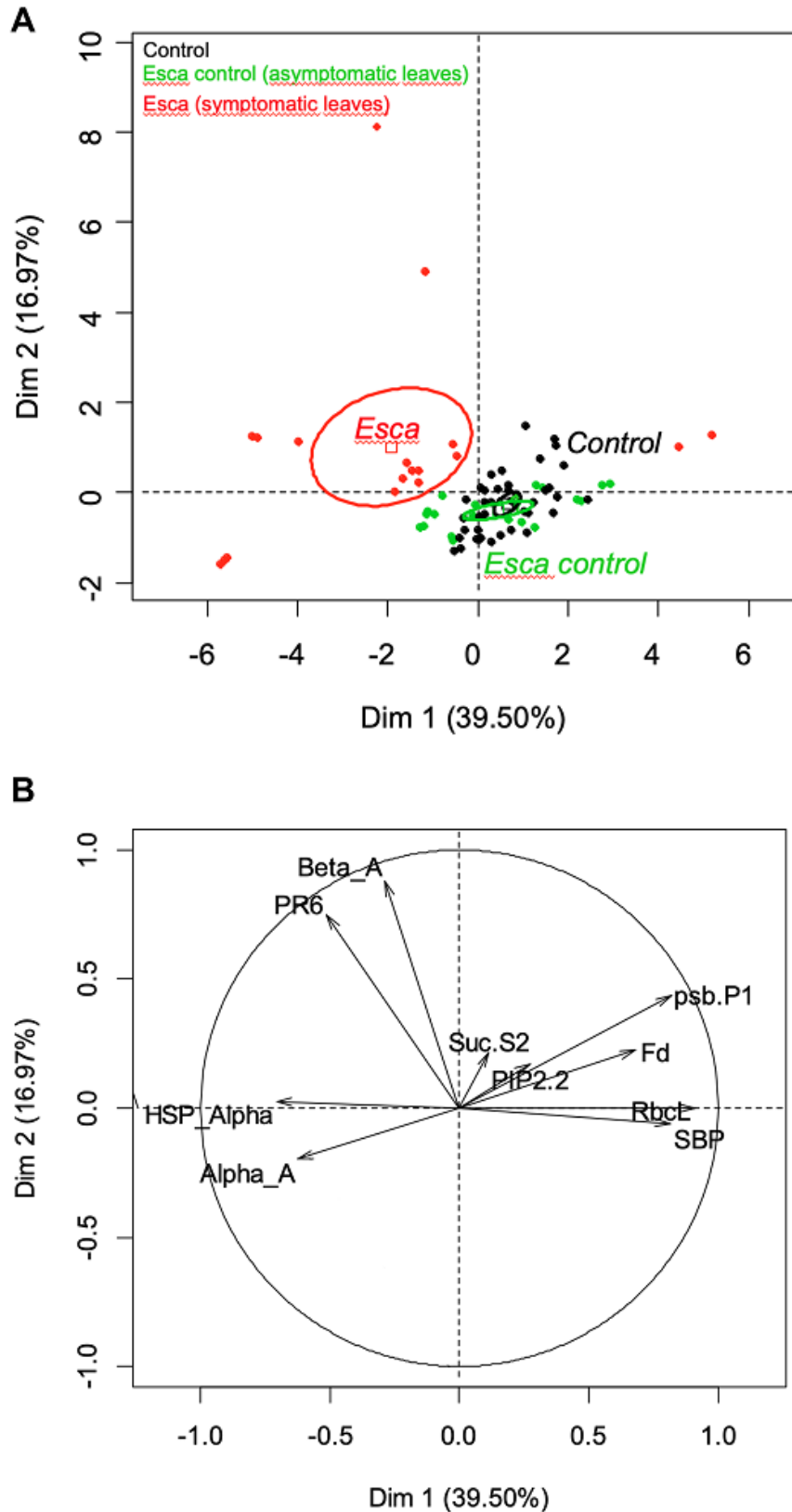


Figure 9: Principal Component Analysis (PCA) of the RT-qPCR results. *Mm*

A) Scatter diagram showing the confidence ellipses for control (black), Esca-asymptomatic (green) and Esca-symptomatic (red) leaf samples. (B) Correlation circle with the two axes of PCA performed for control, Esca-asymptomatic and Esca-symptomatic leaf samples.

Control leaves, sampled from both control and Esca-symptomatic grapevines did not show significant differences in gene-levels expression. The different sampling times and the corresponding increase severity of Esca-foliar symptoms had no impact on the qPCR profiles of control leaves collected from Esca-symptomatic grapevines.

IV. DISCUSSION

IV.1. Climatic context and Esca symptomatology

As regards Esca symptomatology on leaves, it was noticeable that in 2018, the onset of Esca-foliar symptoms happened earlier than in 2017. As reported by Surico *et al.* (2006) [34], Bruez *et al.* (2013) [3], and Songy *et al.* (2019) [35], climate variability can exacerbate, or not, Esca foliar expression. In our experiment, the year 2018 was marked by a mild and cool winter (causing a belated budburst), followed by spring season (in May and June from flowering to fruit setting stages) that was particularly rainy, whereas summer (around mid-July i.e. veraison stage) became unusual. These climatic conditions, with succession of wet and dry periods, favoured an early expression of Esca in 2018 in comparison to 2017. This observation is in line with Surico *et al.* (2000) [36], who reported that chronic Esca foliar expression is associated with hot periods in summer following rainfalls. Lecomte *et al.* (2012) [37], reported also that there was an evolution of Esca-leaf symptoms associated with the progressive increase of mean temperatures in early summer. Therefore, 2018 highest summer temperatures could explain the earlier Esca-symptomatic expression this year. Additionally, the highest values of transpiration were observed in 2018, before the onset of Esca-foliar symptoms. This was certainly due to the greater amount of water available early in 2018, stimulating the development of larger transpiring leaf area. Did these various climatic conditions favour aggressiveness of the GTD-fungal pathogens and the expression of early symptoms? We can make this hypothesis that we hope will be tested in future research studies.

Regarding the quantity and quality of necroses in the wood of grapevines, image analyses performed on the longitudinal sections of trunk and cordons at the end of the monitoring period, revealed the severity level of internal necroses. It was particularly clear

that white rot was always present in plants that expressed Esca-foliar symptoms during the timespan of the experiment. But quantity of white-rot is also a significant point to be considered. As previously reported by Maher *et al.* (2012) [38], and Ouadi *et al.* (2019) [2], our results confirmed that the threshold value of at least 10% of white rot in the cordons is a strong descriptor for the chronic form of Esca.

IV.2. Transpiration response to Esca infection

Regardless of the date of appearance of Esca-foliar symptoms, whole plant-transpiration was systematically about 40 to 50% lower in Esca-diseased grapevines compared to controls. This decrease was observed several weeks before Esca-foliar symptoms appeared and this trend was not affected by air temperature or atmospheric VPD. Thus, the relationship between transpiration values in asymptomatic vs. symptomatic grapevines did not appear to be particularly modified when climatic conditions were characterized by higher temperatures and VPD (Fig. S1). However, higher levels of transpiration were recorded for both symptomatic and control grapevines when the VPD was particularly strong ($>3,5$ kPa) (Figs. S1-B, S1-C). On the contrary, the decline in midday sap flow under dry climatic conditions (Fig. S1) in the Esca-diseased grapevines reflected the decrease in stomatal conductance, and may indicate that soil and roots became more disconnected as soil dried, or that root physiologically was also directly impacted by Esca. Results in grapevine transpiration were consistent with those of the literature. For instance, in walnut trees [39], sap flow sensors are able to detect changes in hydraulic function prior to the onset of obvious visual symptoms. Here with grapevine, the continuous physiological monitoring of sap flow made it possible to demonstrate the decrease in the water transport within Esca-diseased grapevines. Based on the greater amount of wood necroses and their location within the grapevines, it can be suggested that the vascular system is altered [38]. It can therefore be suggested that the loss of grapevine capacity to transport water results from vessel occlusion or destruction due to the internal wood necrosis in the trunk and cordons. Additionally, the formation of tyloses and gummosis can occur within vessels of the leaves as recently demonstrated by Bortolami *et al.* (2019) [8]. As a consequence, the number of functional vessels decreases and the circulatory activity in the whole plant is hindered.

Midday stem water potential (Ψ_{md}) are commonly used for estimating grapevine water status in the field [40]. Measurement of Ψ_{md} is time consuming, which makes it impractical for routine (daily) use. Recently, to determine Ψ_{md} most studies have focused on intra- and inter-daily stem diameter changes, measured with dendrometers and various soil water sensors [41]. In the present study to assess whole plant water use, heat sap flow sensors were employed. Regardless of vineyard specificities, sap flow remains fundamentally dependent on atmospheric conditions. However, beyond the effects of climatic variations, sap flow dynamics also integrate complex interactions between vine functioning, vine structure and soil properties. As such, complex interactions between human activity and environmental factors impacting vine physiological responses are also characterized. Thus, beside atmospheric conditions, sap flow also reflects the impact of present and past cultural practices as well as vine developmental history on plant water use regulation, which is particularly relevant with a perennial crop.

Dynamic changes in tissue water content over space and time can impact the interpretation of plant water use and how various compartments contribute to an integrated response to plant stress. Because it is a fundamental plant-based index, sap flow variations analysis is useful to develop a holistic vineyard monitoring strategy in conjunction with other plant-based methods. Many practical decisions related to vine health and performance can be improved when interpreted within the framework of sap flow variations. In a context of climate change prediction in the Southwest of France, sap flow response analysis is critical to adjust cultural practices in response to extreme climatic events such elevated temperatures, more frequent heat waves, variable precipitations and drier winters [42]. The knowledge generated from a few carefully selected vineyards could then be applied over larger areas where less information is available regarding the Esca-foliar symptomatology. The combination of visual clues with continuous vine water use monitoring can potentially indicate how Esca-diseased grapevines react to vascularization dysfunctions. Methods allowing the direct observation of the xylem loss of hydraulic conductivity, i.e. embolism, in plants such as magnetic resonance imaging (MRI) and X-ray micro computed tomography (microCT) represent other reliable options to visualize the phenomenon [43,44]. These techniques have provided new insights into the structure and function of plant hydraulic networks that improved our understanding and interpretation of datasets captured with sap flow methods and other plant hydraulic and water relations techniques. However,

measurements of vulnerability to embolism in plant organs other than stems such as leaves, suggest that other tissues such as petiole or mesophyll might in fact limit whole-plant conductance, especially considering the foliar symptoms outburst that characterizes Esca disease [8,45]. These findings indicated that grapevines regulate their stomata to prevent xylem embolism and would shed a large proportion of their leaves in order to limit transpiration and the existence of very negative xylem tensions. This pattern of stomatal behaviour is consistent with a strategy of embolism resistance and avoidance [45], and in future studies should be considered along with sap flow measurements when characterizing Esca-foliar symptoms, and their consequences on whole-plant structural and functional acclimations to the infection.

IV.3. Response of complementary physiological indicators to Esca infection

According to Petit *et al.* (2006) [46] and Magnin-Robert *et al.* (2011) [47], Esca-symptomatic leaves are associated with both stomatal closure and alteration of the photosynthetic apparatus. However, the physiological mechanisms underlying the appearance of symptoms have not been yet identified. In those studies, all measurements were performed on both healthy and symptomatic leaves and no recurrent differences in g_s were recorded between asymptomatic leaves of Esca-diseased grapevines and controls over the study period. Only symptomatic leaves appeared to undergo a loss of functionality of their stomatal activity, close to 30%, compared to control leaves. A decrease of total chlorophyll content, efficiency of the photosystem II and a down-regulation of some photosynthesis-related genes was also observed [46,47].

In viticulture, it is important to estimate vine nitrogen (N) availability as it affects the yield, influences the grape fermentation potential and defines the must quality via phenolic activity during grape maturity [48,49]. Water availability and circulatory activity efficiency influences nitrogen uptake [50] and therefore could impact leaf N content in Esca-diseased grapevines. As the Dualex responds linearly to both Chl and Flav leaf content [51], the NBI index can be quantitatively related to leaf N content. The NBI index (Chl/Flav) has been shown to reflect the N availability better than either of the two indicators used individually [52–54] and our study revealed that NBI profiles were significantly lower in symptomatic

leaves. In addition, the 2-year surveillance period confirmed that photosynthetic pigments were severely affected by Esca as Chl significantly decreased with the outbreak of foliar symptoms. In line with this result, Martin *et al.* (2019) [16], recently observed that in Esca-symptomatic leaves from another grapevine cultivar, the Tempranillo, there were lower content of chlorophylls and carotenoids contents and some alterations on their phenolic profiles. Finally, the accumulation of Anth content we recorded in Esca-symptomatic leaves was coherent with the literature, as it has been shown that accumulation of phenolic compounds could be induced by pathogens attack [4].

Dualex measurements revealed that Esca development leads to significant disturbances of leaf metabolism and changes in different phenolic families, at the early stage of symptoms expression. To further decipher the link between the disruptions of the photosynthetic apparatus and Esca expression in grapevine, changes in the activities of certain relevant genes of primary metabolism were also investigated.

IV.4. RT-qPCR leads to detect physiological dysfunction within Esca-symptomatic grapevine leaves

In Esca-symptomatic leaves, drastic alterations of photosynthetic functions are also observed through activation of specific gene defense responses. Activities of certain genes such as RbcL, SBP and psb P1 were coherent with the repression of photosynthetic genes observed in Esca-diseased plants of another grapevine cultivar, i.e. Chardonnay [47,56]. In addition, Esca-symptomatic leaves over-expressed the defense related gene PR6 at an early symptomatic stage, which was consistent with several studies that described an up-regulation of pathogenesis related proteins in Esca symptomatic-leaves [47,56]. Interestingly, upregulation of PR6 in asymptomatic leaves of the same diseased grapevines was also observed.

Regarding asymptomatic leaves that were sampled on both Esca-diseased and healthy control grapevines, our results revealed a general down-regulation of HSP proteins simultaneously at the onset of Esca leaf symptoms. According to Magnin-Robert *et al.* (2016) [57], the protection of cellular functions can be provided by proteins presenting a chaperone role, like the small heat shock proteins. In our study, an overall down-regulation

of HSP expression was observed from stage 75 (berries pea-sized) to stage 89 (end of veraison) in asymptomatic leaves of Esca-diseased grapevines. A low accumulation of these proteins has also been reported in the brown stripe, a typical wood discoloration attributed to *Botryosphaeria dieback* [58]. These results support the hypothesis that HSPs could be related to some cellular dysfunctions associated with the expression of Esca symptoms [57] and that they could be involved in plant resistance mechanism, as shown for Pierce's diseased [59].

In the meantime and for the activity of amylases, an overall up-regulation of Alpha A proteins was recorded in asymptomatic leaves of Esca-diseased plants simultaneously to Esca leaf symptoms appearance, from bunch closure to veraison. A similar but less pronounced trend was found regarding the regulation of Beta A proteins. As shown by Valtaud *et al.* (2009) [60], the occurrence of a higher starch grain content in asymptomatic leaves from healthy canes, rather than those from infected canes, can be considered as a first defence step. A similar accumulation of starch was also reported for *Vitis vinifera* infected with the Esca-pathogen, *P. chlamydospora* [61]. The high amylase activity recorded in asymptomatic leaves sampled on Esca symptomatic vines, led thus to an increased of starch hydrolysis and a higher production of glucose and fructose. Our results were consistent with those of Valtaud *et al.* (2011) [62], which supports the hypothesis that high content of fructose in Esca-diseased leaves would be involved in a detoxification process rather than in the nutrition of wood-inhabiting fungi, as fructose is not preferentially used by Esca pathogens [63]. An increase in hexose content was also noticed in the presence of abiotic stresses [64,65].

To conclude, discrimination between healthy and Esca-diseased grapevines based on measurements of foliar activities, i.e. photosynthetic activity and stomatal conductance, or quantification of compounds, i.e. phenolic compounds, were not relevant because significant differences were observed, only concurrently, or after, the expression of the first foliar symptoms. On the contrary, the sap flow recordings were significantly lower in Esca diseased-plants even several weeks before the appearance of any foliar symptoms. Finally, we can hypothesize that interactions linking internal symptoms, i.e. necrosis such white-rot in the wood, and external ones, i.e. foliar symptoms, take place within the sap flow, suggesting that xylem vessels are a privileged site to study Esca disease.

V. SUPPORTING INFORMATION

Table S1 – List of primers used for RT-qPCR

Gene	Encoding	Primer sequences 5' – 3' (forward/reverse primer)	GenBank or TC TIGR accession number NCBI accession
<i>EF1-α</i>	Elongation factor 1-alpha	AACCAAAATATCCGGAGTAAAAGA GAACTGGGTGCTTGATAGGC	XM_0022848 88.3
<i>60SRP</i>	60S ribosomal protein L18	ATCTACCTCAAGCTCCTAGTC CAATCTTGTCCTCCTTTCCCT	XM_0022705 99.3
<i>αA</i>	Alpha amylase	AGCTTGTGGACTGGGTGAAA GAGGCCCTCCATTTGAGTCC	XM_0022851 77.3
<i>βA</i>	Beta amylase	TACCATACACTATCACACCCATAATCCA GCCTTATCAAACC	XM_0022656 62.3
<i>SucS2</i>	Sucrose synthase 2	TGTGGGCTTCTACATTTGCT CCTTCTGGCATCGTTCAAAGA	XM_0022714 94
<i>RbcL</i>	Large subunit of RuBisCO	AATTTTTCTCTCCACGGCGATA ATCTGCGCCCGCCTTTATA	TC57584
<i>SBP</i>	Sedoheptulose -7- biphosphatase	TGCCAACCCAGCTCCTATTTGA TCAACTGGGCCTCCCATGT	XM_0022630 13.3
<i>psbP1</i>	Oxygen-evolving enhancer PsbP subunit of photosystem II	GCTGACGGAGATGAAGGTGG AACCAAAATATCCGGAGTAAAAGA	AY222741
<i>Fd</i>	Ferredoxin	TGTGGATCAGTCTGACGGGA CTCCTCCTCCTTGTGGGTCT	XM_0022695 81.3
<i>PR6</i>	Serine proteinase inhibitor	AGGGAACAATCGTTACCCAAG CCGATGGTAGGGACACTGAT	AY156047.1
<i>HSP-α</i>	Alpha crystalline heat shock protein	TCGGTGGAGGATGACTTGCT CGTGTGCTGTACGAGCTGAAG	XM_0022723 82.3
<i>PIP2.2</i>	Plasma membrane intrinsic protein aquaporin	TACACAAAAGCCCAAAGCTAACA CAACTAAAAACCCACAACACCC	AF141900

Table S2 – Notation table presenting the status of the 16-year-old Cabernet-Sauvignon cultivar (*Vitis vinifera* L.) that underwent a two-year physiological monitoring in 2017 and 2018. Esca-foliar symptoms observations are symbolized by (×) while healthy grapevines are symbolized by (✓). Grapevines with references ranging from A1 to A6 and S1 to S6 were equipped with sap flow sensors and were uprooted at the end of the experiment.

Grapevine references		2014-2016	2017	2018
Asymptomatic grapevines	A1	✓	✓	✓
	A2	✓	×	✓
	A3	✓	✓	✓
	A4	✓	✓	×
	A5	✓	✓	✓
	A6	✓	✓	✓
	A7	✓	✓	✓
	A8	✓	✓	✓
	A9	✓	✓	✓
	A10	✓	✓	✓
	A11	✓	✓	✓
	A12	✓	✓	×
	A13	✓	✓	✓
	A14	✓	✓	✓
	A15	✓	✓	✓
	A16	✓	✓	✓
Symptomatic grapevines	S1	×	×	✓
	S2	×	×	×
	S3	×	×	×
	S4	×	×	×
	S5	×	✓	×
	S6	×	×	✓
	S7	×	×	✓
	S8	×	×	×
	S9	×	×	✓
	S10	×	×	Apoplectic
	S11	×	×	×
	S12	×	×	×
	S13	×	×	×
	S14	×	×	Apoplectic

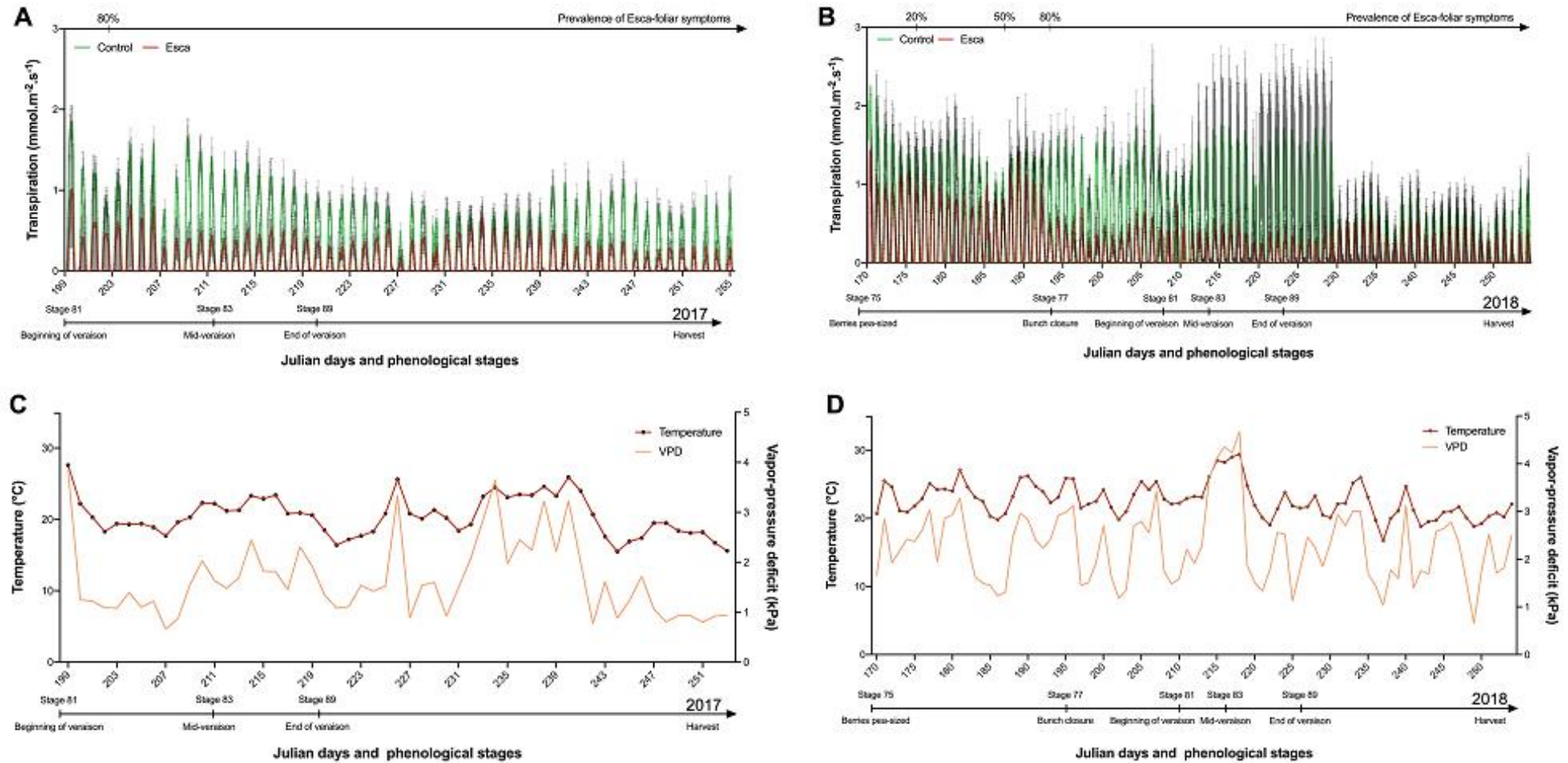


Fig. S1. Evolution of sap flow densities in asymptomatic and symptomatic grapevines under different climatic conditions. (A) Diurnal courses of sap flow densities in asymptomatic and symptomatic grapevines recorded in 2017 (right) and 2018 (left). (B) Evolution of temperature and vapour-pressure deficit conditions in 2017 (right) and 2018 (left). Error bars in panel (A) represent SE.

VI. ACKNOWLEDGMENTS

As a project partner, Fruition Sciences provided the sap flow sensors used in this study to measure the transpiration level of healthy and Esca-diseased plants. On-field experimentations, carried out as part of the industrial Chair “GTDfree” financed by the NRA (National Research Agency), and Jas Hennessy & Co.

VII. REFERENCES

1. Christen, D., Schonmann, S., Jermini, M., Strasser, R.J., Defago, G., 2007. Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to Esca disease by in situ chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 60, 504-514.
2. Ouadi, L., Bruez, E., Bastien, S., Vallance, J., Lecomte, P., Domec, J.C., *et al.* 2019. Ecophysiological impacts of Esca, a devastating grapevine trunk disease, on *Vitis vinifera* L. *Plos One* 14, e0222586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222586>
3. Bruez, E., Lecomte, P., Grosman, J., Doublet, B., Bertsch, C., Fontaine, F., *et al.* 2013. Overview of grapevine trunk diseases in France in the 2000s. *Phytopathologia Mediterranea* 52, 262-275.
4. Guerin-Dubrana, L., Fontaine, F., Mugnai, L., 2019. Grapevine trunk disease in European and Mediterranean vineyards: occurrence, distribution and associated disease-affecting cultural factors. *Phytopathologia Mediterranea* 58, 49-71.
5. Fontaine, F., Gramaje, D., Armengol, J., Smart, R., Nagy, Z. A., Borgo, M., *et al.* 2016. Grapevine trunk diseases. A review. *OIV Publications*.
6. 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.
7. Mondello, V., Larignon, P., Armengol, J., Kortekamp, A., Vaczy, K., Prezman, F., *et al.* 2018. Management of grapevine trunk diseases: knowledge transfer, current strategies and innovative strategies adopted in Europe. *Phytopathologia Mediterranea* 57, 369-383.
8. Bortolami, G., Gambetta, G.A., Delzon, S., Lamarque, L.J., Pouzoulet, J., Badel, E., *et al.* 2019. Exploring the hydraulic failure hypothesis of Esca leaf symptom formation. *Plant physiology*, 591.
9. Bertsch, C., Ramirez - Suero, M., Magnin - Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou - Mansour, E., *et al.* 2013. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology* 62, 243-265.
10. Larignon, P., Dubos, B., 1997. Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 103, 147-157.
11. 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.

12. Martin, L., Martin, M.T, 2013. Characterization of fungicide resistant isolates of *Phaeoacremonium aleophilum* infecting grapevines in Spain. *Crop protection* 52, 141-150.
13. Gramaje, D., Mostert, L., Groenewald, J. Z., Crous, P.W., 2015. *Phaeoacremonium*: from Esca disease to phaeohyphomycosis. *Fungal biology* 119, 759-783.
14. Fischer, M., 2002. A new wood-decaying basidiomycete species associated with Esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). *Mycological Progress* 1, 315-324.
15. Fischer, M., Gonzalez Garcia, V., 2015. An annotated checklist of European basidiomycetes related to white rot of grapevine (*Vitis vinifera*). *Phytopathologia Mediterranea*, 281-298.
16. Martin, L., Fontaine, F., Castano, F. J., Songy, A., Roda, R., Vallet, J., *et al.* 2019. Specific profile of Tempranillo grapevines related to Esca-leaf symptoms and climate conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 135, 575-587.
17. Reis, P., Pierron, R., Larignon, P., Lecomte, P., Abou-Mansour, E., Farine, S., *et al.* 2019. Vitis methods to understand and develop strategies for diagnosis and sustainable control of grapevine trunk diseases. *Phytopathology* 109, 916-931.
18. Granier, A., 1985. Une nouvelle méthode pour la mesure du flux de sève brute dans le tronc des arbres. *Annales des Sciences Forestières* 42, 193-200.
19. Fontaine, F., Pinto, C., Vallet, J., Clément, C., Gomes, A.C., Spagnolo, A., 2016. The effects of grapevine trunk diseases (GTDs) on vine physiology. *European Journal of Plant Pathology* 144, 707-721.
20. Calzarano, F., Fabio, O.S., D'Agostino, V., Alessia, P.E., Della Pelle, F., De Rosso, M., *et al.* 2017. Levels of phytoalexins in vine leaves with different degrees of grapevine leaf stripe disease symptoms (Esca complex of diseases). *Phytopathologia Mediterranea* 56, 494-501.
21. Eichhorn, K.W., Lorenz, H.K., 1977. Phänologische Entwicklungsstadien der Rebe. *Der Deutsche Weinbau*.
22. Goulas, Y., Cerovic, Z.G., Cartelat, A., Moya, I., 2004. Dualex: a new instrument for field measurements of epidermal ultraviolet absorbance by chlorophyll fluorescence. *Applied Optics* 43, 4488-4496.
23. QGIS Development Team (2013). QGIS Geographic Information System. *Open Source Geospatial Foundation Project*. Available from: <http://qgis.osgeo.org>

24. Johnson, L.F., 2003. Temporal stability of an NDVI - LAI relationship in a Napa Valley vineyard. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 9, 96-101.
25. Baker, J.V., Van Bavel, C.H.M., 1987. Measurement of mass flow of water in the stems of herbaceous plants. *Plant, Cell & Environment* 10, 777-782.
26. Peressotti, A., Ham, J.M., 1996. A dual-heater gauge for measuring sap flow with an improved heat-balance method. *Agronomy Journal* 88, 149-155.
27. Cermák, J., Deml, M., Penka, M., 1973. A new method of sap flow rate determination in trees. *Biologia Plantarum* 15, 171-178.
28. Meinzer, F.C., Johnson, D.M., Lachenbruch, B., Mc Culloh, K.A., Woodruff, D.R., 2009. Xylem hydraulic safety margins in woody plants: coordination of stomatal control of xylem tension with hydraulic capacitance. *Functional Ecology* 23, 922-930.
29. Domec, J.C., Palmroth, S., Ward, E., Maier, C.A., Therezien, M., Oren, R.A.M., 2009. Acclimation of leaf hydraulic conductance and stomatal conductance of *Pinus taeda* (loblolly pine) to long - term growth in elevated CO₂ (free - air CO₂ enrichment) and N - fertilization. *Plant, Cell & Environment* 32, 1500-1512.
30. Liminana, J.M., Pacreau, G., Boureau, F., Menard, E., David, S., Himonnet, C., *et al.* 2009. Inner necrosis in grapevine rootstock mother plants in the Cognac area (Charentes, France). *Phytopathologia Mediterranea* 48, 92-100.
31. Reid, K.E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., Lund, S.T., 2006. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology* 6, 27.
32. Livak, K.J., Schmittgen T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402-408.
33. R Core Team., 2016. R: A language and environment for statistical computing. *R foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria. Available from: <https://www.r-project.org/>
34. Surico, G., Mugnai, L., Marchi, G., 2006. Older and more recent observations on Esca: a critical overview. *Phytopathologia Mediterranea* 45, 68-86.
35. Songy, A., Fernandez, O., Clement, C., Larignon, P., Fontaine, F., 2019. Grapevine trunk diseases under thermal and water stresses. *Planta* 249, 1655-1679.
36. Surico, G., Marchi, G., Braccini, P., Mugnai, L., 2000. Epidemiology of Esca in some vineyards in Tuscany (Italy). *Phytopathologia Mediterranea* 39, 190-205.
37. Lecomte, P., Darrieutort, G., Liminana, J.M., Comont, G., Muruamendaraz, A.,

- Legorburu, F.J., *et al.* 2012. New insights into esca of grapevine: the development of foliar symptoms and their association with xylem discoloration. *Plant Disease* 96, 924-934.
38. 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. *Oeno One* 46, 15-27.
39. Mc Elrone, A.J., Grant, J.A., Kluepfel, D.A., 2010. The role of tyloses in crown hydraulic failure of mature walnut trees afflicted by apoplexy disorder. *Tree Physiology* 30, 761-772.
40. Chone, X., van Leeuwen, C., Dubourdieu, D., Gaudillère, J.P. 2001. Stem water potential is a sensitive indicator of grapevine water status. *Annals of Botany* 87, 477-483.
41. Ahiman, O., Naor, A., Friedman, S., Cohen, S., 2017. Determining mid-day stem water potential from sap flow measurements. *X International Workshop on Sap Flow* 1222, 179-184.
42. IPCC, 2018: global warming of 1.5°C. *An IPCC special report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty* [online]. 2018. Available from: <https://www.ipcc.ch/sr15/> [Accessed July 15 2019].
43. Knipfer, T., Cuneo, I.F., Brodersen, C.R., Mc Elrone, A.J., 2016. In situ visualization of the dynamics in xylem embolism formation and removal in the absence of root pressure: a study on excised grapevine stems. *Plant Physiology* 171, 1024-1036.
44. Choat, B., Drayton, W.M., Brodersen, C., Matthews, M.A., Shackel, K.A., Wada, H., *et al.* 2010. Measurement of vulnerability to water stress - induced cavitation in grapevine: a comparison of four techniques applied to a long - vesseled species. *Plant, Cell & Environment* 33, 1502-1512.
45. Hochberg, U., Albuquerque, C., Rachmilevitch, S., Cochard, H., David - Schwartz, R., Brodersen, C.R., *et al.* 2016. Grapevine petioles are more sensitive to drought induced embolism than stems: evidence from in vivo MRI and microcomputed tomography observations of hydraulic vulnerability segmentation. *Plant, Cell & Environment* 39, 1886-1894.
46. Petit, A.N., Vaillant, N., Boulay, M., Clement, C., Fontaine, F., 2006. Alteration of photosynthesis in grapevines affected by Esca. *Phytopathology* 96, 1060-1066.
47. Magnin-Robert, M., Letousey, P., Spagnolo, A., Rabenoelina, F., Jacquens, L., Mercier,

- L., *et al.* 2011. Leaf stripe form of Esca induces alteration of photosynthesis and defence reactions in presymptomatic leaves. *Functional Plant Biology* 38, 856-866.
48. Soubeyrand, E., Basteau, C., Hilbert, G., van Leeuwen, C., Delrot, S., Gomes, E., 2014. Nitrogen supply affects anthocyanin biosynthetic and regulatory genes in grapevine cv. Cabernet-Sauvignon berries. *Phytochemistry* 103, 38-49.
49. Cerovic, Z.G., Ghazlen, N.B., Milhade, C., Obert, M., Debuisson, S., Moigne, M.L., 2015. Nondestructive diagnostic test for nitrogen nutrition of grapevine (*Vitis vinifera* L.) based on dual-ex leaf-clip measurements in the field. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 3669-3680.
50. Farquhar, G.D., Buckley, T.N., Miller, J.M., 2002. Optimal stomatal control in relation to leaf area and nitrogen content. *Silva Fennica* 36, 625-637.
51. Louis, J., Meyer, S., Maunoury-Danger, F., Fresneau, C., Meudec, E., Cerovic, Z.G., 2009. Seasonal changes in optically assessed epidermal phenolic compounds and chlorophyll contents in leaves of sessile oak (*Quercus petraea*): towards signatures of phenological stage. *Functional Plant Biology* 36, 732-741.
52. Meyer, S., Cerovic, Z.G., Goulas, Y., Montpied, P., Demotes-Mainard, S., Bidet, L.P.R., *et al.* 2006. Relationships between optically assessed polyphenols and chlorophyll contents, and leaf mass per area ratio in woody plants: a signature of the carbon–nitrogen balance within leaves? *Plant, Cell & Environment* 29, 1338-1348.
53. Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., Tattini, M., 2013. Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry* 72, 35-45.
54. Agati, G., Foschi, L., Grossi, N., Volterrani, M., 2015. In field non-invasive sensing of the nitrogen status in hybrid bermudagrass (*Cynodon dactylon* × *C. transvaalensis* Burt Davy) by a fluorescence-based method. *European Journal of Agronomy* 63, 89-96.
55. Lima, M.R., Felgueiras, M.L., Cunha, A., Chicau, G., Ferreres, F., Dias, A.C., 2017. Differential phenolic production in leaves of *Vitis vinifera* cv. Alvarinho affected with Esca disease. *Plant Physiology and Biochemistry* 112, 45-52.
56. Letousey, P., Baillieul, F., Perrot, G., Rabenoelina, F., Boulay, M., Vaillant-Gaveau, N., *et al.* 2010. Early events prior to visual symptoms in the apoplectic form of grapevine Esca disease. *Phytopathology* 100, 424-431.
57. Magnin-Robert, M., Spagnolo, A., Boulanger, A., Joyeux, C., Clement, C., Abou-Mansour, E., *et al.* 2016. Changes in plant metabolism and accumulation of fungal

metabolites in response to Esca proper and apoplexy expression in the whole grapevine. *Phytopathology* 106, 541-553.

58. Spagnolo, A., Larignon, P., Magnin-Robert, M., Hovasse, A., Cilindre, C., van Dorsselaer, A., *et al.* 2014. Flowering as the most highly sensitive period of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv Mourvèdre) to the Botryosphaeria dieback agents *Neofusicoccum parvum* and *Diplodia seriata* infection. *International Journal of Molecular Sciences* 15, 9644-9669.

59. Yang, L., Lin, H., Takahashi, Y., Chen, F., Walker, M.A., Civerolo, E.L., 2011. Proteomic analysis of grapevine stem in response to *Xylella fastidiosa* inoculation. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 75, 90-99.

60. Valtaud, C., Foyer, C.H., Fleurat-Lessard, P., Bourbouloux, A., 2009. Systemic effects on leaf glutathione metabolism and defence protein expression caused by Esca infection in grapevines. *Functional Plant Biology* 36, 260-279.

61. Troccoli, L., Mugnai, L., Surico, G., Calamassi, R., Mori, B., 2001. *Phaeoemoniella chlamydospora*-grapevine interaction. Histochemical reactions to fungal infection (*Vitis vinifera* L.). *Phytopathologia Mediterranea* 40, 400-406.

62. Valtaud, C., Thibault, F., Larignon, P., Bertsch, C., Fleurat-Lessard, P., Bourbouloux, A., 2011. Systemic damage in leaf metabolism caused by Esca infection in grapevines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 17, 101-110.

63. Luini, E., 2007. Implication de toxines fongiques dans l'Esca de la vigne, mise au point d'un test de diagnostic et recherche d'un traitement contre la maladie (Doctoral dissertation, Poitiers : Université de Poitiers).

64. Creelius, F., Streb, P., Feierabend, J., 2003. Malate metabolism and reactions of oxidoreduction in cold - hardened winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *Journal of Experimental Botany* 54, 1075-1083.

65. Bogdanovic, J., Mojovic, M., Milosavic, N., Mitrovic, A., Vucinic, Z., Spasojevic, I., 2008. Role of fructose in the adaptation of plants to cold-induced oxidative stress. *European Biophysics Journal* 37, 1241-1246.

Chapitre 3 - Comparaison de deux modes de taille sur la physiologie des ceps. Liens avec l'expression de l'Esca

I. INTRODUCTION

Depuis la fin du siècle dernier, la viticulture a beaucoup évolué. En réponse à l'essor de la concurrence internationale dans le secteur viticole, la profession s'est focalisée sur la qualité des vins produits, parfois au détriment des pratiques culturales [361]. La réémergence des maladies de dépérissement comme l'Esca, impose aujourd'hui à la filière viticole, de se réapproprier des principes fondamentaux de bonnes pratiques agronomiques, pour améliorer l'état sanitaire des parcelles infectées. A l'échelle mondiale, un nombre croissant de régions viticoles se développe dans des conditions semi-arides, exerçant sur la vigne de plus fortes contraintes climatiques. La diminution de la disponibilité en eau, l'augmentation des températures moyennes et la recrudescence des problèmes sanitaires liés aux restrictions d'usages des produits phytosanitaires, rendent nécessaire l'optimisation des pratiques viticoles.

Parmi les pratiques culturales qui ont un effet significatif sur le développement de la vigne, la taille des ceps est un mode opératoire quasi généralisé. Elle est réalisée pour augmenter les rendements ainsi que la qualité des baies et au final, celle du produit que l'on souhaite obtenir, le vin ou le jus de raisin. Dans son état naturel, la vigne est protégée de la dessiccation et des attaques extérieures par l'écorce. Les plaies formées au niveau des ceps lors de la taille supprime cette barrière naturelle et déclenche le mécanisme de compartimentation et la formation de structures appelées, cônes de dessiccation, en réponse à la création de ces plaies. Lorsque la taille est effectuée au ras du bois pérenne (cordon ou tronc), les plaies formées offrent une porte d'entrée aux agents fongiques pathogènes des MDB, ce qui entraîne des taux d'infection potentiellement plus élevés par ces champignons [206], et accroît le risque pathologique pour ces vignes. Le développement de bois nécrosé qui s'en suit pourra participer à la détérioration des vaisseaux et induire des perturbations au

niveau des flux de sève qui les parcourent [362]. Le transport de l'eau du xylème vers les feuilles sera ainsi réduit et la transpiration modifiée [353], l'ensemble pouvant conduire à l'apparition de formes apoplectiques [246]. Pour limiter ce risque de dépérissement, il est donc nécessaire de préserver la fonctionnalité des flux de sève lors de la taille et la formation de cônes de dessèchements associée à cette pratique.

Afin d'obtenir des informations sur l'impact des types de taille de la vigne et sur le développement des MDB, un réseau de surveillance a été mis en place depuis 2007 dans le cadre d'un projet CASDAR (Compte d'Affectation Spécial « Développement Agricole et Rural ») puis d'un projet de chaire industrielle nommé GTDfree. Lecomte *et al.* (2018) [8], ont montré, après 10 ans d'expérimentation, que la qualité de la taille a bien une influence sur l'expression de l'Esca. Par contre, la taille favorisant les cordons longs minimise les conséquences de la formation de nécroses sur le développement de l'Esca. A l'inverse, les ceps ayant subi une taille rase, à l'origine de la formation de larges plaies, peuvent présenter des cônes de dessiccations particulièrement étendus, ce qui tendrait à accélérer le processus de dépérissement [8,113,196]. D'autres auteurs avaient aussi rapporté que les tailles rases semblent être plus sensibles à l'infection par les champignons des MDB lorsqu'elles sont effectuées sur du vieux bois, en comparaison avec des plaies observées sur du bois d'un an d'âge [363].

Le calcul des pertes dans les vignobles en France montre des chiffres très élevés. D'après les dernières estimations de l'observatoire des MDB, le taux moyen de ceps improductifs atteint 16,8 % en 2018 pour le vignoble charentais. Ce taux, composé de ceps morts et manquants, de jeunes plants non productifs de moins d'un an et de plants gravement atteints par les maladies de dépérissement, dont l'Esca, passe à 19,7% si l'on inclut les entreplants de trois ans ou moins. Au total, l'équivalent d'un cep sur cinq est improductif dans le vignoble charentais. Afin de réduire ces pertes considérables, une solution pour lutter contre le dépérissement à l'Esca consisterait à mettre en œuvre une taille censée être « respectueuse » des flux de sève. L'avantage serait que, le faible nombre de plaies de taille généré sur les ceps, ainsi que leur dimension réduite, limiteraient le développement de nécroses dans le bois (Fig. 7).

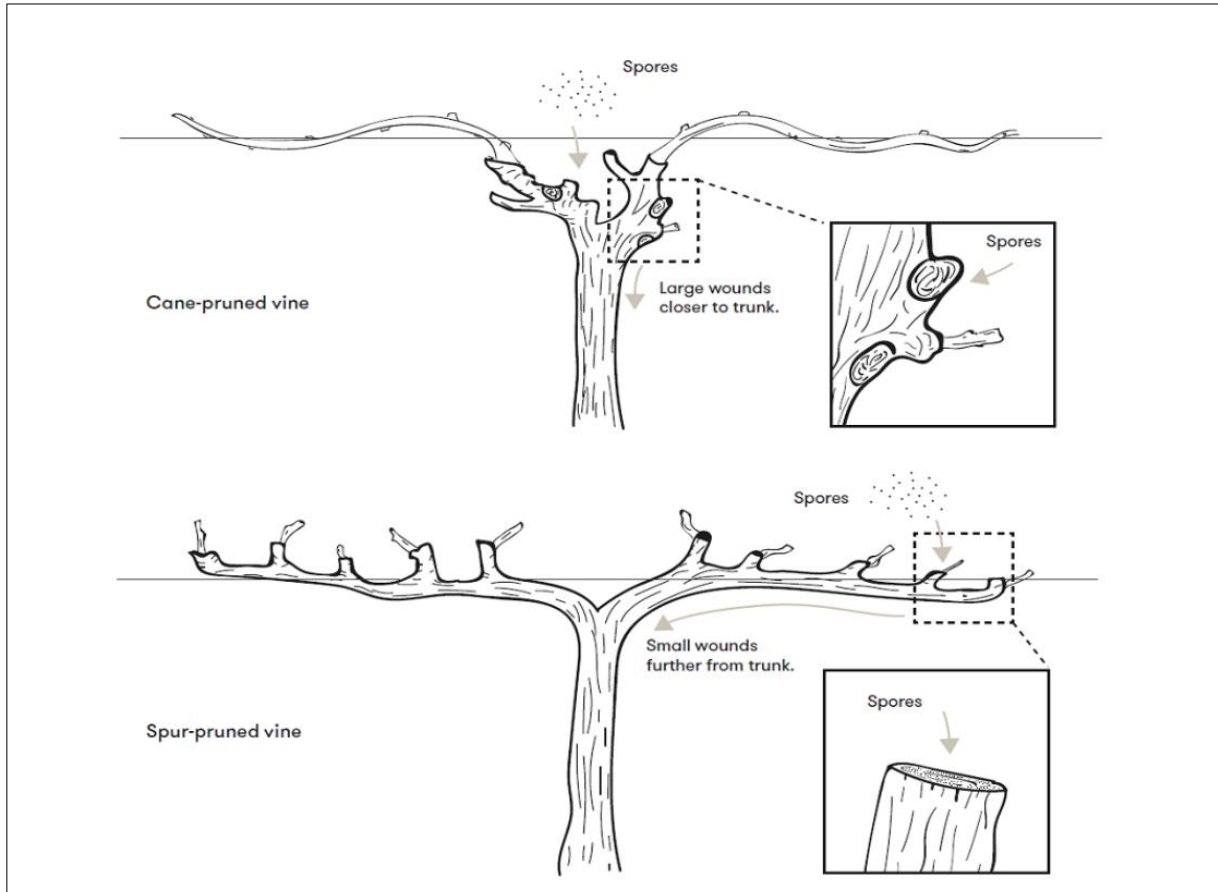


Figure 10: Corrélation entre le système de taille et l'infection par les champignons des maladies du bois (Sosnowski, 2016)

Les techniques de taille qui priorisent une coupe rase peuvent paraître plus esthétiques, mais elles entraînent une détérioration interne au niveau des flux de sève et d'importantes plaies de taille à la surface du bois. A ce titre, la taille Guyot-Poussard (Fig 8) permet de concentrer les zones de plaies de taille sur la partie supérieure des bras, tout en assurant un espacement suffisant des plaies. L'objectif de ce mode de conduite, est de créer un « courant de sève » sur la face inférieure des bras, éloignant ainsi les vaisseaux fonctionnels de la zone taillée, que les agents pathogènes de l'Esca peuvent aisément coloniser.

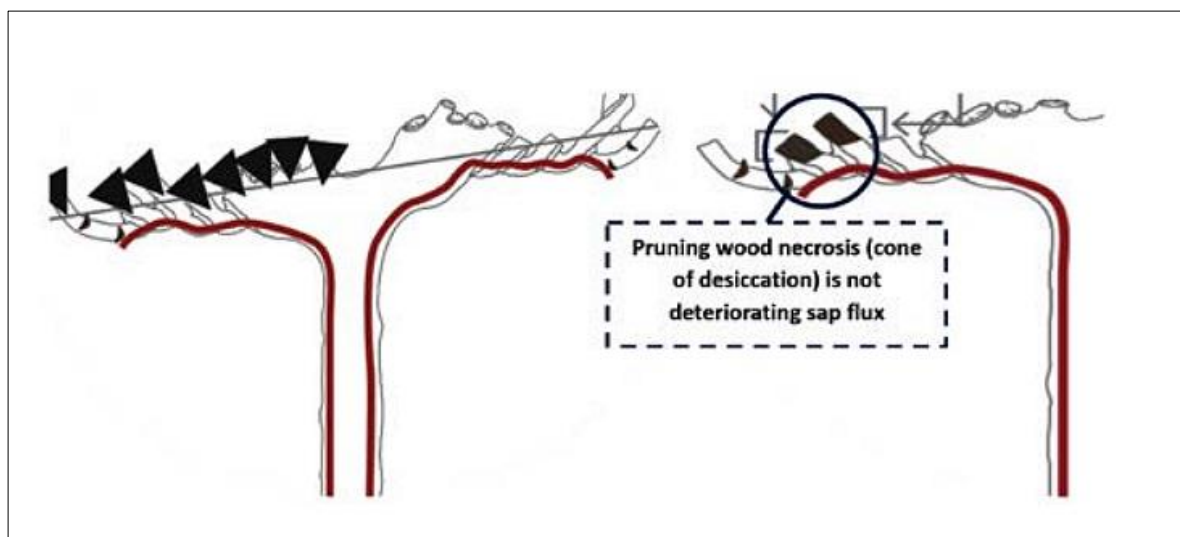


Figure 11: Guyot-Poussard : taille orientée qui préserve les flux de sève. (Légende : triangles noir = plaies de tailles, lignes rouges = flux de sève). (<http://simonitesirch.com>).

La taille dite, « Simonit & Sirch », reprend le principe de respect des flux de sève décrit par la taille Guyot-Poussard, et propose une méthode pouvant s'adapter à toutes les formes de conduite de la vigne. Ce type de taille « Simonit & Sirch » a trois objectifs :

1. Le premier objectif est de guider le développement des ramifications latérales, également appelées « coursons », afin qu'ils soient alignés dans l'axe des rangs de vigne. Cette première étape de ramification amène à considérer les espaces à disposition pour le développement de la plante, dès l'implantation de la parcelle. Lors de cette implantation, manuelle ou mécanique, le fait de planter les ceps dans la même direction i.e. les coursons orientés dans l'axe du rang et positionnés du même côté pour tous les ceps, permet de faciliter et d'homogénéiser le futur entretien des vignes comme la taille, l'ébourgeonnage ou l'épamprage.
2. Le deuxième objectif consiste à optimiser la continuité du flux de sève et à séparer les zones de dessiccation du flux principal de sève. Pour se faire, il est nécessaire de positionner les plaies de taille successives systématiquement du même côté, pour permettre la séparation de la zone de bois mort formé par le cône de dessiccation, de la partie vivante, fonctionnelle, qui concentre les flux de sève.

3. La troisième caractéristique concerne la typologie des plaies de faible dimension, localisées sur du bois âgé d'un ou deux ans. Ce système de taille ramifiée, réduit considérablement la surface des plaies de taille exposées vers l'extérieur et limite le risque de colonisation du bois par des champignons pathogènes. Par sécurité, pour les tailles effectuées sur du bois de deux ans, il est recommandé de maintenir un chicot, qui sera éliminé l'année suivante. Il s'agit d'une portion de bois qui permet d'éloigner le cône de dessiccation du flux principal de sève et constitue une défense supplémentaire pour la plante contre la colonisation des agents pathogènes. Ce mode de taille répond à un double objectif, celui de la productivité des pieds de vigne et celui de sa pérennité. Le choix de la baguette fructifère répond à la recherche de productivité, et le choix du courson au besoin de pérennité. Par ailleurs, cette méthode de taille, peut être adaptée en fonction des habitudes techniques et du mode de conduite propres à la région considérée, par exemple la taille chablis en Champagne, la taille Guyot-simple en Bourgogne ou celle appelée Guyot-double arquée en Alsace.

Les méthodes de taille censées être « respectueuses » des flux de sève n'ont pas pour ambition d'éradiquer l'Esca mais d'éviter l'apoplexie du pied, pouvant s'exprimer suite à plusieurs années de tailles mutilantes successives. L'application de cette taille dans les vignobles infectés, à pour objectif de préserver la vitalité des ceps en réorientant leur équilibre vasculaire. La méthode « Simonit & Sirch », permet ainsi d'orienter la formation d'un cep de vigne, pour qu'il soit en mesure de coexister avec les agents pathogènes de l'Esca, et que sa structure soit principalement constituée de bois vivant. Pour garantir son expertise scientifique, l'instauration de cette taille ramifiée sur une parcelle est néanmoins problématique, car elle suppose un long temps d'installation, que ce soit par l'implantation d'une nouvelle parcelle ou par l'adaptation de ce nouveau mode de conduite sur des vignes préexistantes. En effet, la difficulté de mettre en place un nouveau mode de taille sur une ancienne parcelle réside dans l'historique individuel de chaque cep car les années de tailles et de plaies successives, complexifient la réorientation de l'équilibre vasculaire du cep. Dans le but de lever ces verrous scientifiques, une parcelle de démonstration a été mise en place dans le cadre du projet GTDfree et utilisée dans cette thèse.

La méthode de taille « Simonit & Sirch » a été utilisée dans l'un des axes de recherche du projet GTDfree, lauréat de l'appel à projets lancé par l'entreprise « Jas Hennessy & Co » en décembre 2014, puis retenue pour le programme Chaire industrielle de l'Agence National de la Recherche (ANR) en 2016. La parcelle de démonstration évoquée ci-avant, où différents types de taille ont été appliqués, a été mise en place en Charentes, au sein du vignoble Hennessy. Cette parcelle de démonstration a pour ambition de répondre aux attentes de la profession viticole sur la diffusion de pratiques culturales permettant de réduire efficacement l'impact des MDB sur le vignoble. Deux modes de taille y sont pratiqués depuis Mars 2016 : une taille « Simonit & Sirch » censée être « respectueuse » des trajets de sève et supposée « vertueuse ». Elle a été réalisée par les Maîtres tailleurs « Simonit & Sirch ». L'autre taille, a priori, « non vertueuse », est classiquement utilisée dans les vignobles.

L'un de l'objectif de cette étude a été de réaliser un suivi exhaustif de l'état physiologique des ceps de cette parcelle, en fonction des deux modes de taille appliqués. A long terme, les résultats permettront de valider, nuancer ou rejeter scientifiquement l'intérêt pour les viticulteurs d'adopter la taille censée être « respectueuse » des trajets de sève dans le cadre de la lutte contre le dépérissement à l'Esca. En fonction des résultats obtenus, ce mode de conduite pourra être adapté à chaque cépage en fonction de sa vigueur naturelle et de la longueur de ses entre-nœuds. Dans le cadre d'un renouvellement de parcelle, il sera également alors possible de réfléchir à l'espacement des ceps de vigne, dès leur implantation, afin de faciliter les futures opérations de taille, propres à ce mode de conduite respectueux des trajets de sève.

II. Matériels et méthodes

II.1. Matériel végétal

La parcelle de démonstration sur laquelle l'étude a été réalisée est une parcelle d'Ugni Blanc plantée en 2004, située en Charentes sur le domaine de Douvesse, appartenant à la Maison Hennessy (groupe LVMH). Les ceps âgés de 15 ans sont suivis pour l'expression des maladies du bois de la vigne depuis 2016. Il s'agit d'une jeune parcelle, sur laquelle peu de ceps ont exprimé des symptômes foliaires d'Esca (moins de 1%). Afin de réaliser un

diagnostic physiologique représentatif de la parcelle, 30 ceps ont été sélectionnés et répartis en deux groupes: 15 ceps taillés selon la méthode « Simonit & Sirch », dans le respect des flux de sève et notés (V+) ; 15 ceps taillés de façon plus mutilante et notés (V-).

Des indicateurs physiologiques clés, permettant de caractériser la vigueur, la vitesse de croissance, le rendement ainsi que l'efficacité de fonctionnement des stomates et de la photosynthèse au niveau des feuilles ont été suivis pendant deux années consécutives. La première année de surveillance, effectuée en 2017, correspond à l'année « zéro » de mise en place des différentes modalités de taille sur la parcelle de démonstration. En particulier pour la taille respectueuse des flux de sève, l'année 2017 correspond à la taille de « formation ». Afin de laisser la vigne se ramifier naturellement, et partir d'une base saine, un seul courson est établi pour chaque bras. Ainsi, pour former un cordon à deux bras, deux sarments sont attachés à plat la première année. L'hiver suivant, le premier rameau orienté vers le haut sera conservé pour former le premier courson et les bras seront rabattus sur un sarment plus éloigné, partant du bas du cep, qui sera taillé à trois ou quatre bourgeons. Ce bout de sarment sera attaché à plat, dans le prolongement des bras, et servira de base pour le développement d'un deuxième courson l'année suivante. Cette taille de formation permet d'établir des cordons à quatre cots, et il suffit de renouveler l'opération, une année de plus pour former des cordons à six cots.

Une station météorologique située à moins d'un kilomètre de la parcelle de démonstration, a été utilisée pour caractériser le climat de la parcelle. La température de l'air et les précipitations ont été enregistrées quotidiennement pendant toute la durée de l'étude.

II.2. Indicateurs physiologiques

Le protocole de mesure pour le suivi des indicateurs physiologiques foliaires, conductance stomatique et mesures d'indices optiques au Dualex, est identique à celui décrit dans le chapitre 2 « Assessment of sap flow disruption related with the physiological and genetic reponses following Esca infection of *Vitis vinifera* L. ».

II.2.1. Conductance stomatique (g_s)

Les mesures de conductance stomatique (g_s) ont été effectuées avec un poromètre Li-Cor 1600 (Li-Cor Corp., Lincoln, NE, USA) sur les 30 vignes sélectionnées pour l'étude, pendant deux saisons consécutives. Seules les feuilles vertes, matures, complètement développées et bénéficiant d'une bonne exposition solaire, ont été mesurées, avec un minimum de deux répétitions par bras. Pour chaque cep, un rameau par cordon a été sélectionné, et les mesures ont systématiquement été effectuées sur les feuilles n° 5 et n° 7 à partir de l'apex. La feuille dont la veine centrale mesurait plus de 3 cm a été considérée comme la feuille n° 1. Pour chacune des deux années de suivi physiologique, les mesures ont été réalisées sur les mêmes feuilles, à raison d'une fois par semaine, entre 10h00 et 12h00. En raison de la fréquence élevée des traitements phytosanitaires sur la parcelle de démonstration, courants à cette période de l'année dans la région viticole de Cognac, un total de sept semaines de suivi a pu être atteint en 2017 et neuf semaines en 2018. Ces mesures se sont toutefois étalées de la fin de la floraison (fin Juin) jusqu'à la véraison (fin Août).

II.2.2. Mesures d'indices optiques foliaires (Dualex®)

Une pince Dualex Scientific+ (Force-A, Orsay, France) a été utilisée pour mesurer quatre indices optiques foliaires permettant d'estimer le statut en azoté des feuilles et d'évaluer leur teneur en composés phénoliques : la chlorophylle (Chl), les flavonols épidermiques (Flav), et l'indice de bilan azoté (NBI) correspondant au rapport des deux indices antérieurs. Le principe de fonctionnement du Dualex, basé sur la mesure de la fluorescence de la chlorophylle, a été décrit par Goulas *et al.* (2004) [364].

Cet appareil permet de quantifier le pool de flavonols et d'anthocyanes épidermiques en comparant la fluorescence de la chlorophylle (proche infrarouge) issue d'une première excitation de référence (610 nm) à une seconde excitation spécifique du phénol étudié (UV-A pour les Flav). Une portion de l'onde émise par l'appareil est absorbée par les phénols épidermiques, et le signal restant produit l'excitation de la chlorophylle entraînant un second phénomène de fluorescence dans le proche infrarouge. Le pool de chlorophylles est alors estimé au travers de leur absorbance caractéristique à 710 nm. Une seconde émission, proche infrarouge, prend en compte la structure de la feuille afin d'affiner la mesure. Les mesures

au Dualex ont été effectuées entre 12h00 et 13h00, à la même période et sur les mêmes feuilles que celles suivies pour la conductance stomatique (g_s).

II.3. Indicateurs agronomiques

Pour apprécier la vigueur des ceps en fonction des modalités de taille pratiquées, un comptage du nombre de bourgeons a été effectué au moment de la taille, suivi par la mesure du poids des bois de taille. Un comptage des bourgeons a également été réalisé au moment du débourrement. Parmi les composantes du rendement mesuré, le poids des baies, le poids des grappes et le nombre de baies par grappe ont été estimés pour chacune des deux modalités de taille (V+) et (V-). Une répétition des mesures de chaque indicateur agronomique a été réalisée sur trois blocs répartis dans la parcelle d'expérimentation. Pour apprécier la vigueur des ceps en fonction des modalités de taille pratiquées, la mesure du poids des bois de taille a été réalisée à la taille. Puis, le comptage des bourgeons laissés à la taille et de ceux en cours de débourrement (stade 05 selon l'échelle BBCH [22], bourgeon dans le coton) a été réalisé au cours du printemps. Ces deux paramètres ont permis de calculer le pourcentage de débourrement par ceps et par modalité ($\%D = (\text{nombre total de bourgeons débouffés par pied} / \text{nombre total d'yeux laissés à la taille par pied}) * 100$). Parmi les composantes du rendement mesurées, le poids des baies, le poids des grappes à la récolte, ainsi que le calcul du nombre de baies par grappe ont été estimés pour chacune des deux modalités de taille (V+) et (V-).

II.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel R [365]. Afin de déterminer si les indicateurs physiologiques suivis présentaient des différences en fonction des modes de conduites (V+) et (V-), des analyses de variance (ANOVA) ont été effectuées. Pour chaque indicateur, la normalité des résidus a été testée par un test de Shapiro-Wilk. Lorsque les tests de validation n'étaient pas significatifs, un test non paramétrique a été utilisé (Kruskal-Wallis). Les tests ont été considérés comme significatifs pour une valeur de $p < 0,05$.

III. Résultats

III.1. Contexte expérimental

La première campagne de taille de cette expérimentation a débuté en mars 2017. Elle a été réalisée par les maîtres tailleurs de la société « Simonit & Sirch ». Ainsi, la saison 2017 correspond à l'année « zéro » de mise en place des modalités de taille (V+) et (V-) sur la parcelle de démonstration. Malheureusement, des épisodes de gel puis de grêle ont frappé la parcelle au cours du mois d'avril 2017 (Fig. 12). Ces accidents climatiques ayant fortement impacté l'état des bourgeons primaires en cours de débourrement, l'année suivante (2018), les maîtres tailleurs ont dû effectuer une taille de rattrapage pour reformer l'architecture des bras des ceps, retardant d'une année la mise en place de l'expérimentation sur la parcelle de démonstration. En conséquence, les modalités de taille (V+) et (V-) n'ont pu être installées correctement qu'en 2019. En l'absence d'aléas climatiques, la saison 2019 constituera la première année réelle pour laquelle les modalités de taille, mises en place sur la parcelle, pourront être comparées aux résultats de l'année « zéro » (2017) de manière significative.

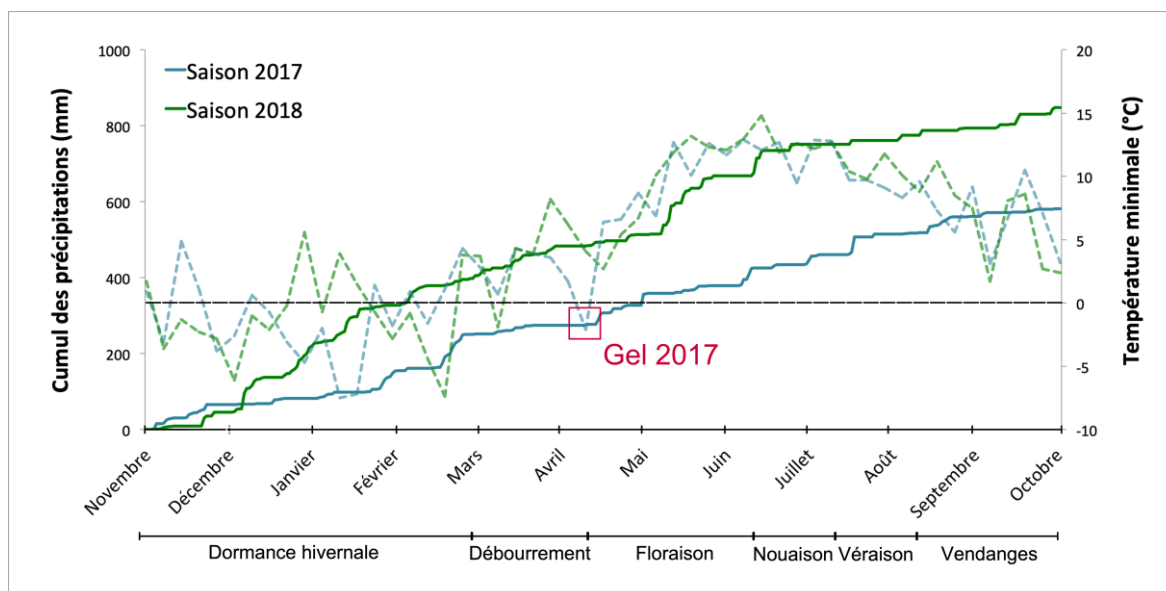


Figure 12: Présentation des conditions climatiques des deux années de suivi physiologique.

Pour chaque campagne de mesure (2017 en bleu) et (2018 en vert), le graphique présente le cumul des précipitations (lignes continues) et les températures minimales enregistrées par la station météo (lignes pointillées).

L'état sanitaire des vignes a été un facteur déterminant pour sélectionner la parcelle de démonstration. Depuis sa plantation en 2006, seuls quelques cas isolés de dépérissement ont été observés sur l'ensemble de la parcelle. La mise en place des différentes modalités de taille a ainsi pu être effectuée sans risque de biais, associés à l'apparition de symptômes de dépérissement. En effet, bien que l'Ugni-blanc fasse partie des cépages les plus sensibles à l'Esca, aucun symptôme foliaire de cette maladie n'a été observé pour les 30 ceps suivis au cours des deux années d'expérimentation.

III.2. Indicateurs physiologiques

Au cours de la campagne de mesure 2017, correspondant à l'année « zéro » de mise en place des modalités de taille (V+) et (V-), le suivi de la conductance stomatique (g_s) (Figure 10A) et des différents indicateurs foliaires mesurés par la pince Dualex (Fig 14) n'a révélé aucune différence significative entre les modalités, selon le test de Kruskal-Wallis. Cette absence de différence a permis de confirmer l'homogénéité physiologique de l'ensemble de la parcelle d'expérimentation au moment de la mise en place de l'étude. Comme nous l'avons précédemment présenté, pour la campagne 2018, les aléas climatiques du mois d'avril 2017 ne nous permettent pas de comparer les modalités (V+) et (V-). Néanmoins, nous pouvons constater qu'indépendamment des modalités de taille, l'épisode de gel ne semble pas avoir provoqué de perturbation physiologique notable, au niveau de la conductance stomatique (Fig. 13). Les valeurs moyennes enregistrées pour g_s en 2018 sont similaires à celles de 2017 et varient entre 200 et 500 $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ces résultats attestent que l'épisode de gel n'a pas impacté l'efficacité de fonctionnement stomatique des ceps suivis. En conséquence, pour l'année suivante, cet accident climatique ne devrait pas avoir d'impact négatif sur le suivi de la réponse physiologique des ceps aux différentes modalités de taille.

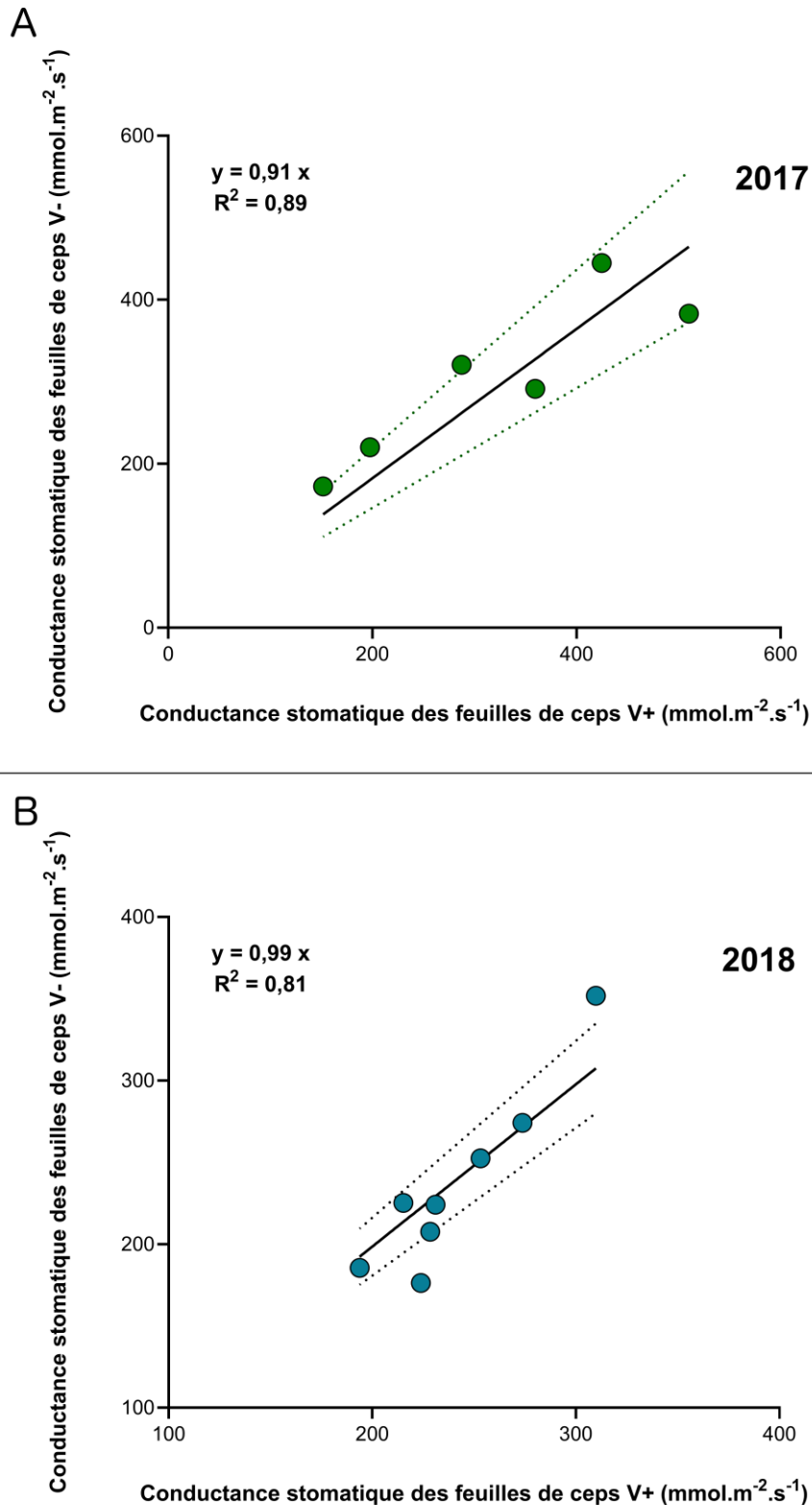


Figure 13: Comparaison de la conductance stomatique (g_s) des feuilles mesurées sur des ceps taillés dans le respect des flux de sève (V+) par rapport à des ceps à taille rase (V-). Les données représentées correspondent aux différents jours de mesures effectuées et ont été calculées à partir d'un échantillon de 60 feuilles par modalité. (A) Conductance stomatique moyenne des ceps V+ et V- pour la campagne 2017. (B) Conductance stomatique moyenne V+ et V- pour la campagne 2018. Pour les deux graphiques, la droite de régression linéaire et l'intervalle de confiance à 95% ont été représentés.

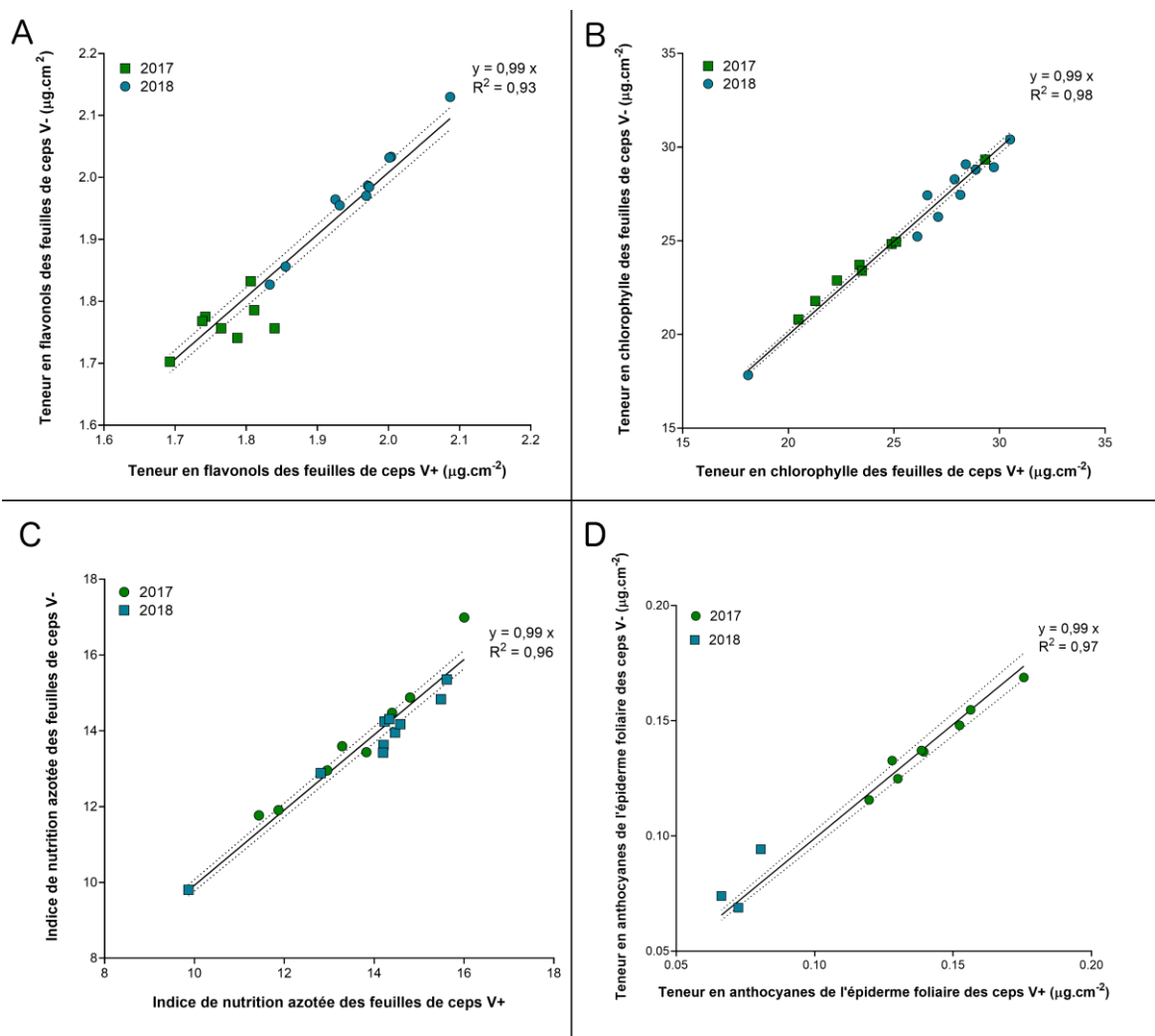


Figure 14: Comparaison de l'évolution de trois indicateurs physiologiques foliaires en fonction d'une taille respectueuse des flux de sève (V+) et d'une taille rase (V-).

Les données représentées correspondent aux différents jours de mesures effectuées au cours de la saison 2017 (carrés verts) et 2018 (ronds bleus), et ont été calculées à partir d'un échantillon de 60 feuilles par modalité. La campagne 2018, impactée par le gel d'Avril 2017 ne permet pas d'interpréter les résultats en fonction des modalités de taille (V+) et (V-). (A) Teneur en flavonols (Flav) (B) Teneur en chlorophylle (Chl) (C) Indice de nutrition azoté (NBI). Pour les trois graphiques, la droite de régression linéaire et l'intervalle de confiance à 95% ont été représentés.

La succession de saisons hivernales particulièrement froides, marquées notamment par l'épisode de gel d'avril 2017, semble avoir légèrement influencé la teneur en flavonols de la campagne 2018 (Fig11A). Indépendamment des modalités de taille, une teneur moyenne en flavonols plus élevée a été enregistrée au cours de la saison végétative 2018, et pourrait être

la conséquence des températures particulièrement froides enregistrées au début de saison (Fig. 12). Néanmoins, l'absence de différences significatives témoigne d'une réponse physiologique homogène des ceps suivis face à cet aléa climatique. Ces résultats confirment que les modalités de taille pourront être comparées lors du millésime 2019, sans qu'aucun biais n'ait été instauré par les épisodes de gels et de grêle de la saison 2018.

Plusieurs indicateurs permettant de suivre la **vitesse de croissance** des plants ont été suivis. Ils ont permis d'estimer la vigueur des ceps i.e. mesurer la reprise de croissance en terme de qualité (période de débourrement) et de quantité (nombre de bourgeons). Pour l'année 2017, qu'il s'agisse du nombre de bourgeons laissés à la taille, de leur taux de débourrement, ou du poids des bois de taille qui portent ces mêmes bourgeons, aucun indicateur de vigueur n'a révélé de différence significative ($p > 0,05$) entre les tailles (V+) et (V-) d'après le test de Kruskal-Wallis (Fig 15). Ces résultats permettent de confirmer l'homogénéité physiologique de l'ensemble de la parcelle d'expérimentation au moment de la mise en place des modalités de tailles.

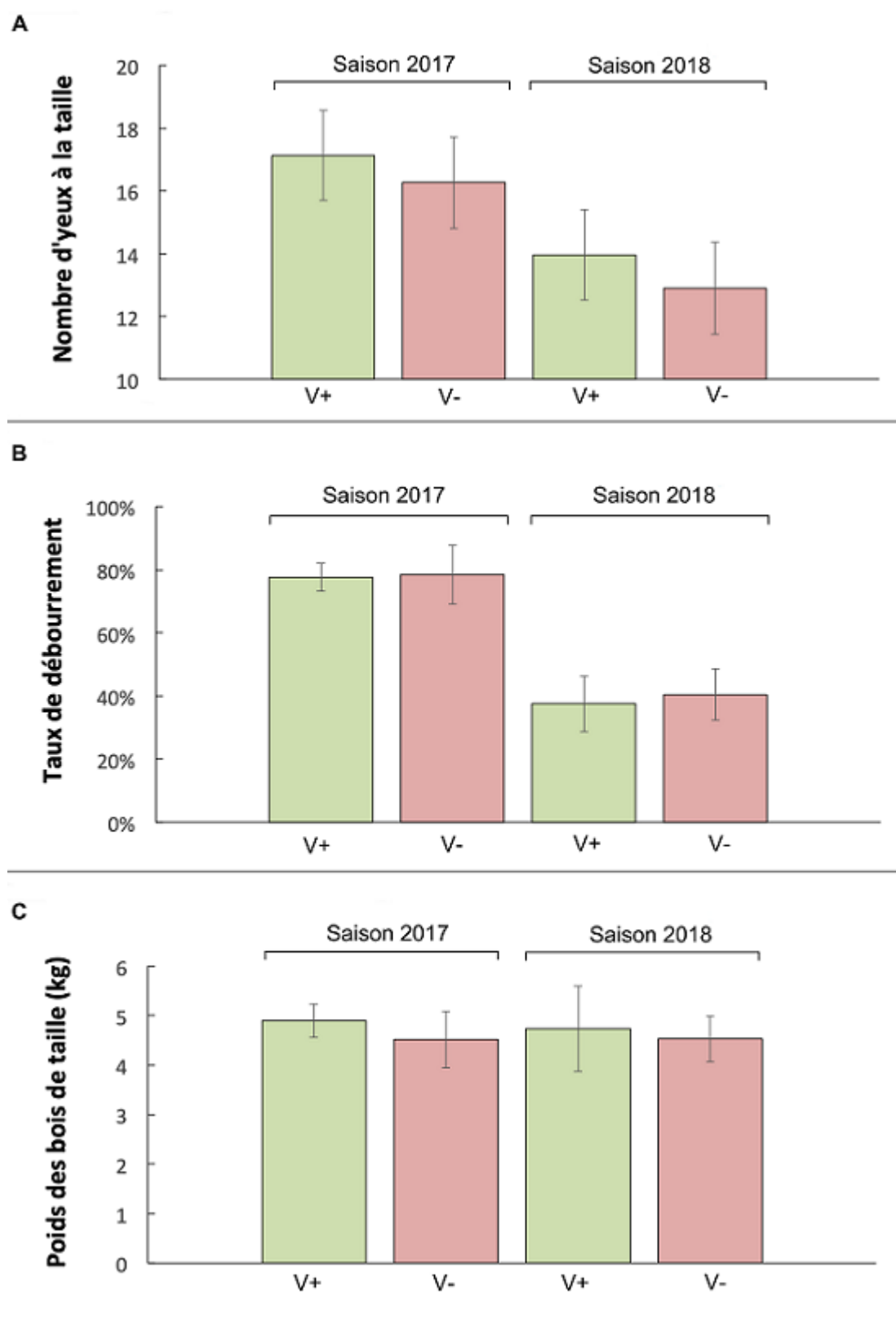


Figure 15: Comparaison de trois indicateurs de vigueur entre des ceps ayant subi une taille respectueuse des flux de sève (V+) et des ceps à taille rase (V-).

(A) Nombre d'yeux à la taille. Les yeux correspondent aux bourgeons laissés à la taille. (B) Taux de débournement (C) Poids des bois de taille. (Source : C. Chollet ISVV).

Le faible taux de débourrement de la campagne 2018, témoigne néanmoins des conséquences néfastes de l'épisode de gel d'avril 2017 sur la production (Fig 15B). Ces résultats, justifient également l'intérêt d'avoir pratiqué une taille de rattrapage afin de limiter les conséquences de cet accident climatique sur le taux de débourrement du millésime suivant.

Pour les trois composantes de rendements mesurées pendant la campagne 2017, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été observée entre les différentes modalités de taille (Fig 16). Par ailleurs, indépendamment des modalités (V+) et (V-), les trois indicateurs mesurés i.e. le poids des baies, le poids des grappes et le nombre de baies par grappe, ont peu évolués entre les deux campagnes de mesures 2017 et 2018. Ces résultats semblent confirmer que la taille de rattrapage effectuée suite au gel d'avril 2017, a permis de limiter efficacement l'impact de cet accident climatique sur le rendement des ceps, et de maintenir un niveau de production homogène. De nouveau, cette absence de différences significatives atteste de l'homogénéité de la parcelle de démonstration au moment de la mise en place des expérimentations.

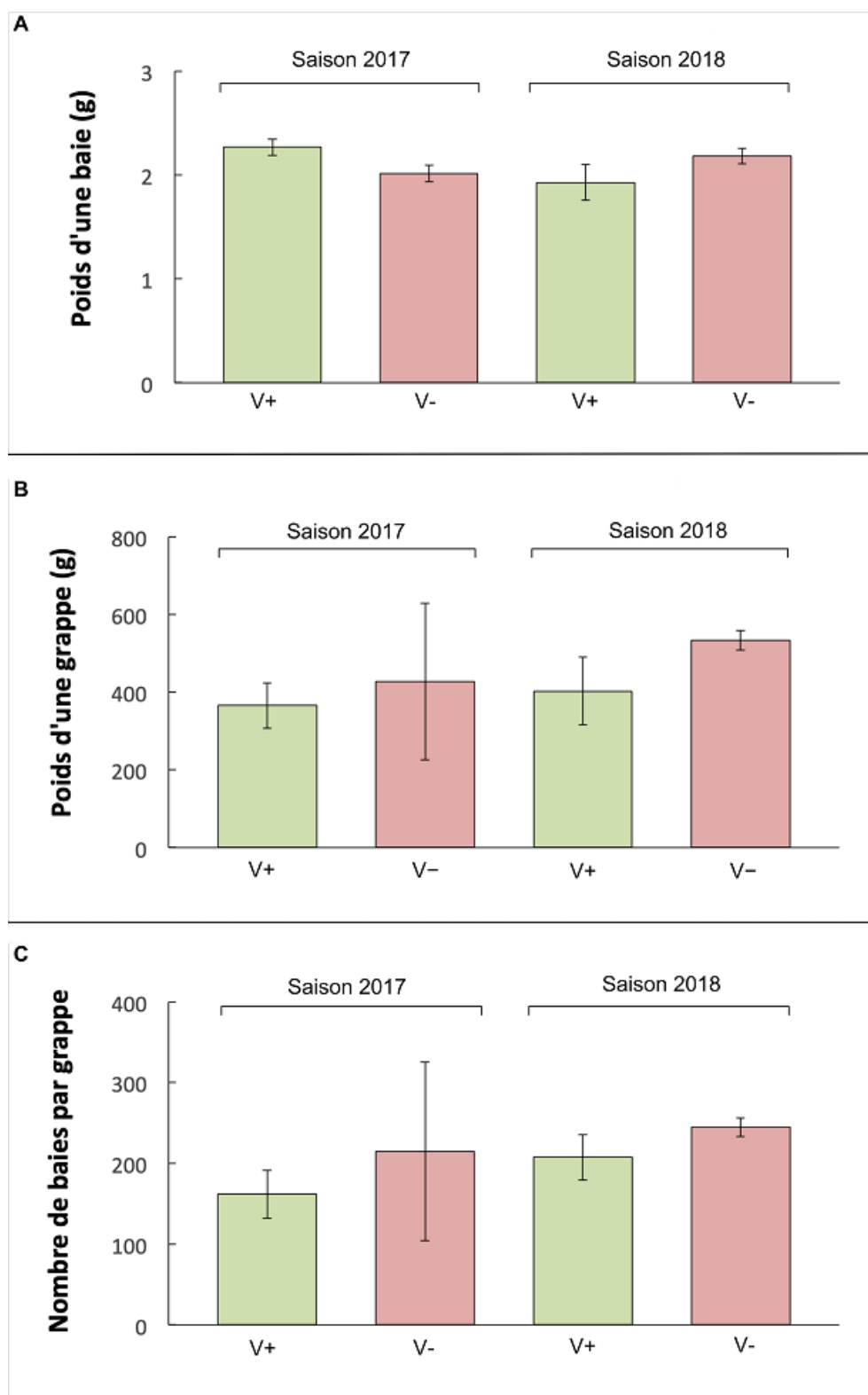


Figure 16: Comparaison de trois composants de rendement entre des ceps ayant subi une taille respectueuse des flux de sève (V+) et des ceps à taille rase (V-).

(A) Poids d'une baie (B) Poids d'une grappe (C) Nombre de baies par grappe. (Source : C. Chollet ISVV)

IV. Discussion

La taille reste, à ce jour, la dernière opération non mécanisable dans la plupart des cahiers des charges des appellations françaises. Elle fait partie des opérations viticoles les plus consommatrice en temps de travail et est une des pratiques les plus pénibles. La taille de la vigne est cependant une étape clé de l'itinéraire cultural viticole. Dans un premier temps, c'est elle qui permet de construire l'architecture du cep *via* la taille de formation. Puis, tout au long de la vie du cep, c'est par la taille d'entretien, ou dite hivernale, que l'architecture est maintenue et que le rendement est contrôlé. De ce fait, elle constitue l'une des composantes principales du rendement. La structure du cep et l'aspect visuel de nos vignobles sont la conséquence directe des choix opérés lors de la taille hivernale. A ces dimensions agronomiques et paysagères s'ajoute la dimension « sociologique ». Pour de nombreux acteurs du monde viticole, une vigne bien entretenue commence par une vigne visuellement « bien taillée » [366], en particulier dans les vignobles majoritairement en Appellation d'Origine Protégée (AOP).

Dans le cadre du projet GTDfree, la création d'une parcelle de démonstration, permettant d'évaluer l'impact de la qualité de la taille d'entretien sur le dépérissement des ceps à l'Esca, a débuté en 2016. Les premiers résultats obtenus en 2017 correspondent à l'année « zéro » de la mise en place des modalités de taille, et serviront de références pour les futures campagnes expérimentales.

Les deux années de suivi de mesures physiologiques réalisées en 2017 et 2018 ont permis d'attester de la bonne homogénéité de la parcelle en suivant plusieurs indicateurs clés du développement de la vigne. Les ceps des deux modalités de taille (V+ et V-) ne présentent pas de différences significatives en termes de vigueur. De même, pour les différents indicateurs physiologiques suivis, aucune différence significative n'a été observée. Un comportement homogène de l'ensemble des ceps des deux modalités (V+) (V-) par rapport à l'émission de flavonols, molécules potentiellement impliquées dans les systèmes de défense de la vigne, a aussi été mis en évidence. Une teneur moyenne plus élevée en flavonols a été enregistrée au niveau des feuilles en 2018, et cela pour l'ensemble des pieds expérimentaux. Ce phénomène pourrait être lié à la conséquence de l'épisode de gel d'avril 2017, additionné aux basses températures ayant marqué le début de la saison 2018 (Fig.

12). L'accumulation de la teneur en flavonols peut être induite par divers agents biotiques ou abiotiques comme une blessure [367,368], une attaque de pathogène [369,370], ou une lumière élevée associée à des températures froides [371–374]. L'absence de différences entre les modalités témoigne de la réponse physiologique homogène des plants face au stress abiotique induit par les aléas climatiques. Cette homogénéité de départ a permis d'éliminer la possibilité d'un éventuel biais dans le comportement physiologique des ceps à l'année « zéro » ce qui permettra, à moyen terme, d'attribuer l'émergence de différences significative aux modalités de tailles.

Dans le cadre du projet GTDfree, en complément des mesures effectuées dans le cadre de la thèse, d'autres ont été faites par l'équipe de l'UR Œnologie de l'ISVV à Bordeaux. Les résultats les plus intéressants, à ce stade de l'expérimentation, ont été ceux obtenus par la Dr C. Cholet sur les cônes de dessiccation. Ils montrent que, chez les ceps taillés de façon « vertueuse », la présence d'un diaphragme au-dessus de la plaie permettrait d'éviter l'extension de la zone de cicatrisation aux vaisseaux du rameau porteur (Fig 17). En conséquence, les flux de sève traversant ces vaisseaux seraient moins perturbés qu'avec l'autre type de taille. Ces résultats devront être confirmés à l'avenir.

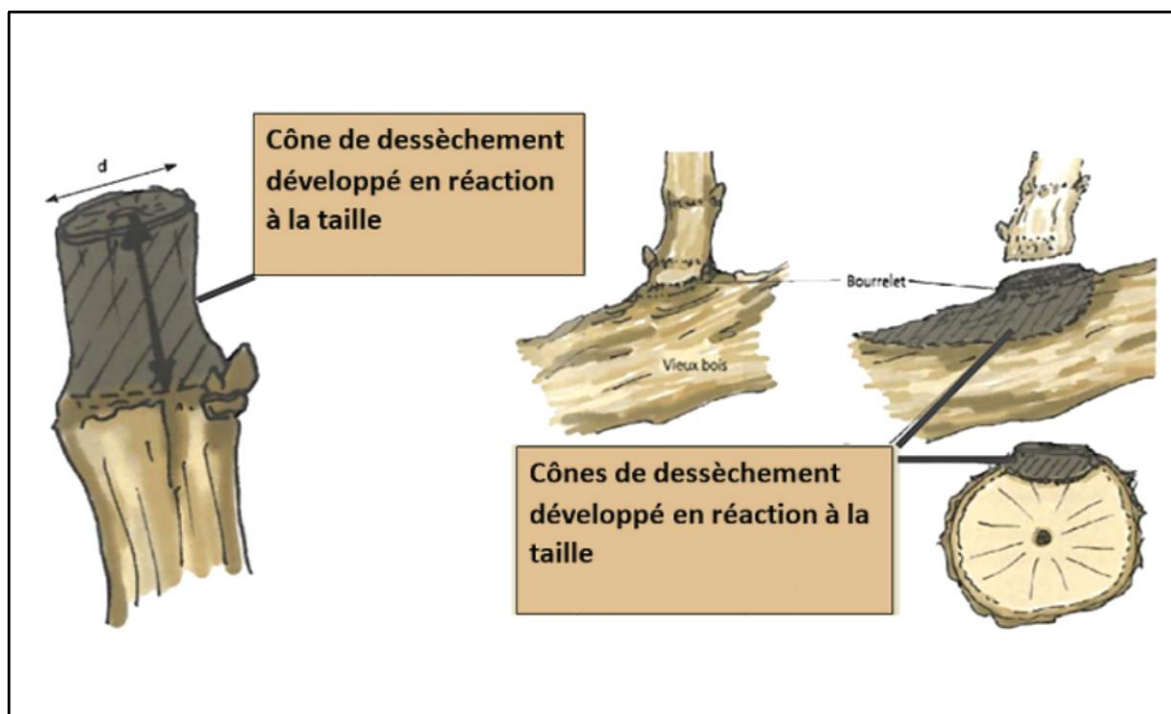


Figure 17: Corrélation entre le développement des plaies de taille et des nécroses (cônes de dessiccation) (à gauche : baguette et courson d'un an; à droite : coupe rase sur du vieux bois). (Crespy, 2006) [362].

Finalement, l'aléa climatique 2017 n'a eu pour conséquence que de décaler d'un an la mise en place de la première année pour laquelle la comparaison réelle des modalités de taille pourra être effectuée de manière significative. Il nous a surtout donné l'opportunité de constater une homogénéité de la réponse physiologique de l'ensemble des ceps expérimentaux au stress abiotique, validant le bon choix de cette parcelle d'expérimentation. Dans les prochaines années, cette homogénéité de départ ainsi que le très faible taux d'expression d'Esca initial de cette parcelle permettra de suivre la réponse physiologique des ceps en lien avec la qualité de la taille, en particulier au niveau de leur vascularisation, ceci indépendamment de l'expression de symptômes foliaires. Il faut être conscient que ce dispositif expérimental ne permettra d'avoir des résultats solides qu'à moyen et longs termes. Plusieurs années de taille consécutives seront nécessaires pour parvenir à convertir complètement les ceps (V+) avec une véritable taille censée respecter les trajets de sève. L'ensemble de ces observations sera donc poursuivi pendant plusieurs années avant de pouvoir confirmer, en fonction des conditions climatiques, le lien entre la conduite d'une taille « respectueuse » des flux de sève, le fonctionnement physiologique du cep et des rameaux porteurs, et le risque de développement de l'Esca.

Chapitre 4 - Discussion générale et perspectives

I. Contexte général

Les maladies du bois de la vigne (MDB), font partie des pathologies parmi les plus anciennement connues au monde, toutes plantes considérées. Larignon (2016) [126], rapporte que les termes employés par les agronomes au cours des siècles, e.g. par les romains ou au Moyen-Age, sont évidemment différents de ceux utilisés aujourd'hui mais ils évoquent des symptômes typiques des MDB comme des nécroses dans le bois, des décolorations foliaires, associées à des dépérissements, parfois foudroyants. Plus récemment à la fin du 19^{ème} siècle et dans la première moitié du 20^{ème} siècle, afin de nommer cette maladie, des termes évoquant l'ampleur des dégâts lui sont donnés. Ces termes montrent cependant une certaine imprécision quant à la pathologie affectant le cep. Ces appellations sont : « la paralysie de la vigne » en Charentes, « le coup de soleil », « la mortalité » dans le Bas-Languedoc, « escalda », « llampa » ou « apoplejia » en Espagne, « mal des spacco » en Italie. Tout cela généra des débats, comme celui sur l'apoplexie et l'esca qui devraient être différenciés selon certains et regroupés pour d'autres, sans qu'un consensus satisfaisant les scientifiques, ni la logique, ne puisse être trouvé [126].

Depuis cette époque, les connaissances sur les MDB ont beaucoup progressé mais la diversité des nécroses dans le bois et les symptômes foliaires, la période courte ou longue (i.e. plusieurs années) pendant lequel le cep va dépérir pour finalement mourir, ou parfois se rétablir, font que les MDB restent très difficiles à appréhender au niveau de leur description. Actuellement des noms très différents sont donnés à ce que l'on appellera ici l'Esca : GLSD, l'esca forme chronique ou forme foudroyante, la continuité entre ces deux formes est aussi rapportée, « esca proper », maladie de Pétri chez les plants jeunes, etc. **On peut résumer la situation en écrivant que si les connaissances ont avancé, la complexité des appellations demeure et aucun consensus n'a encore été trouvé.**

Ces dernières années, un fait nouveau est apparu lorsque des scientifiques ont rapporté que les champignons pathogènes ne seraient pas la cause principale de l'Esca, puisqu'on les retrouve chez des vignes asymptomatiques [375]. Néanmoins, d'autres pensent le contraire car ils ont montré que l'inoculation de ces champignons crée des nécroses dans le bois, par contre l'apparition des symptômes foliaires n'est pas fréquente et est la plupart du temps mal maîtrisée. Ce dernier point semble particulièrement intéressant et pourrait être une des causes de cette complexité. **Pour notre part, nous voulons souligner un fait qui semble général aux MDB et pourrait être consensuel : sans nécroses dans le bois, il n'y a pas apparition de symptômes au niveau des feuilles et donc pas de MDB, ici, d'Esca.** La diversité des symptômes foliaires pourrait être due à la diversité des nécroses colonisées par différents champignons pathogènes, certains étant plus nombreux et actifs que d'autres dans le bois à un moment donné de la vie du cep.

Etablir un lien entre symptômes internes (nécroses dans le bois) et symptômes externes (au niveau des feuilles) nous semble donc primordial pour comprendre cette maladie et c'est en suivant ce principe que cette thèse a été réalisée. Le but étant de se focaliser sur les mécanismes physiologiques sous-jacents au dépérissement des ceps.

Par ailleurs, l'amélioration du diagnostic physiologique des plants contaminés par l'Esca est importante dans le contexte du changement climatique, caractérisé par une réduction des précipitations estivales [9], ce qui expose les plants à un stress et vraisemblablement à un risque accru d'Esca et de sa forme sévère, l'apoplexie. L'apparition erratique des symptômes foliaires d'Esca rend aussi difficile la surveillance de la maladie au vignoble et n'a toujours pas été expliquée scientifiquement [117,376].

Les hypothèses permettant d'expliquer la pathogénèse de l'Esca peuvent être classées en deux catégories :

1. **l'hypothèse de défaillance hydraulique** dans laquelle l'embolie gazeuse, l'occlusion ou la destruction, totale ou partielle, des vaisseaux perturberait les flux de sève dans le xylème et conduirait à la dessiccation des feuilles ;
2. **l'hypothèse « éliciteur-toxine »** selon laquelle des métabolites secondaires, ou des toxines produits par les champignons pathogènes présents dans les nécroses, se propageraient via le flux de sève et induiraient les symptômes foliaires à distance [377].

L'hypothèse basée sur un dysfonctionnement vasculaire a été peu étudiée, mais les perturbations mesurées au niveau de la conductance stomatique et de la photosynthèse dans des feuilles pré-symptomatiques et symptomatiques constituent des arguments en sa faveur [208,377–379]. D'autre part, l'hypothèse « éliciteur-toxine » s'appuie sur de nombreux travaux ayant permis d'identifier un large panel de phytotoxines, d'effecteurs et d'autres métabolites secondaires potentiellement impliqués dans l'étiologie de la maladie [97,164,380]. Une accumulation de certains composés phénoliques antioxydants a également été mesurée dans des plants pré-symptomatiques [2,208,381] et des signaux générés par la plante, en réponse à l'infection (hormones, molécules de défenses, etc.) pourraient participer à l'expression de l'Esca [382]. Enfin, les champignons trachéomycotiques, comme Pch et Pmin, pourraient être directement ou indirectement responsables de l'expression des symptômes foliaires car ils sont fréquemment isolés du bois issu de ceps symptomatiques [132,383,384]. Plusieurs études ont montré que certaines toxines ou filtrats de cultures de champignons trachéomycotiques pouvaient entraîner une décoloration et une nécrose des feuilles, sans pour autant correspondre à la réplication exacte du motif caractéristique de l'Esca [118,143,176,385]. L'expression d'autres molécules, émises par d'autres microorganismes ou lors d'interactions entre microorganismes colonisant par exemple les nécroses n'est pas à exclure, mais à notre connaissance, cet aspect n'a pas été étudié.

A la vue des résultats actuels, ces deux hypothèses permettraient d'expliquer l'apparition des symptômes foliaires d'Esca. Cependant, le manque de connaissances sur les mécanismes physiologiques sous-jacents à l'expression irrégulière des symptômes d'Esca, constitue un verrou scientifique au diagnostic complet de la maladie

II. Objectif principal de la thèse et discussion des résultats

Dans ce contexte, les travaux engagés dans cette thèse ont visé à répondre à deux questionnements spécifiques aux MDB, plus particulièrement à l'Esca :

1. la compréhension des dysfonctionnements physiologiques associés à cette maladie et du métabolisme de la plante avant et après apparition des symptômes foliaires ;

2. l'étude d'une conduite appropriée des ceps pour éviter le développement de l'Esca, i.e. une méthode de taille censée préserver l'intégrité des vignes, dont le fonctionnement des vaisseaux traversés par des flux de sève, par rapport à une méthode conventionnelle qui les abimerait.

La première partie de ce travail de thèse a consisté à réaliser un suivi temporel de la réponse écophysologique de ceps infectés par l'Esca, avant et après l'expression des symptômes foliaires. La complexité de ce dépérissement, repose notamment sur le fait que les ceps malades ayant développé des symptômes internes, i.e. des nécroses importantes dans le bois, peuvent se confondre visuellement avec des ceps sains car, hormis les symptômes externes, i.e. ceux au niveau foliaire, aucun indicateur extérieur ne permet, à l'heure actuelle, de déterminer si le cep développera des symptômes d'Esca (nécroses internes et symptômes foliaires), et dans quelle proportion. En se basant sur les hypothèses décrites précédemment, le suivi de paramètres physiologiques, liés au fonctionnement vasculaire des plants, permettrait d'identifier de façon précoce les ceps dépérissant et concourir à une meilleure gestion des parcelles.

Le but a donc été d'identifier des paramètres physiologiques pouvant servir de bio-indicateurs dans l'évaluation du niveau de dépérissement d'un cep à l'Esca, indépendamment de l'expression de symptômes foliaires. Afin d'identifier ces indicateurs, une analyse détaillée des paramètres physiologiques liés à la vascularisation des ceps et à l'efficacité de fonctionnement du métabolisme primaire, a été réalisée. Afin de comparer au vignoble, l'efficacité de circulation de l'eau dans des ceps sains et symptomatiques, avant et après l'expression de symptômes foliaires, deux types de capteurs de flux de sève, dont un spécifiquement adapté à la vigne, ont été utilisés et une analyse quantitative et qualitative des perturbations vasculaires de différents ceps a été réalisée.

Deux expérimentations, dans des parcelles de Cabernet Sauvignon, ont été menées dans un vignoble de la région de Bordeaux, le château Luchey-Halde appartenant à l'école d'ingénieur en agronomie, Bordeaux Sciences Agro.

La première parcelle d'étude, suivie pour l'expression des symptômes d'Esca depuis 2015, a permis de construire l'approche méthodologique de ce premier axe de thèse. Une

campagne de mesures physiologique y a été menée en 2016, avec pour but de comparer le fonctionnement vasculaire de ceps sains et de ceps symptomatiques. Les objectifs spécifiques étaient (i) de localiser et de quantifier les surfaces de bois nécrosés dans le tronc et les bras de vignes asymptomatiques et de vignes ayant exprimé des symptômes foliaires d'Esca pendant deux années consécutives; (ii) mesurer la réponse écophysologique de la vigne à l'Esca grâce au suivi des paramètres liés au transport et à la perte d'eau : les flux de sève, la conductance stomatique, la transpiration des feuilles; et (iii) déterminer les conséquences de la maladie sur l'efficacité d'utilisation de l'eau par la plante en ayant recours aux isotopes stables du carbone et de l'oxygène sur des prélèvements de bois et de feuilles.

L'installation de capteurs thermiques dans le tronc des ceps, afin de suivre en continue les flux de sève, a permis de discriminer des ceps sains de ceux infectés par l'Esca. Chez les ceps qui vont devenir symptomatiques, une transpiration 30% plus faible que chez les ceps témoins a été mesurée une semaine avant que les premiers symptômes foliaires d'Esca n'apparaissent. A la fin de la campagne de mesure, conformément à la littérature, les coupes transversales, réalisées sur le tronc et les bras des ceps malades, ont révélé la présence de ponctuations noires, formant de longues stries longitudinales, localisées au niveau des vaisseaux fonctionnels [38,98]. Par ailleurs, contrairement aux ceps sains, une proportion d'amadou de 15% à 50% par rapport à la surface totale de bois, a systématiquement été retrouvée dans le tronc et les bras des ceps symptomatiques. Ces résultats, cohérents avec d'autres observations réalisées dans le tronc de ceps atteints d'Esca [38,196,353], confirment l'hypothèse selon laquelle l'infection se propagerait de façon multidirectionnelle, aussi bien dans le plan transversal que longitudinal. Un phénomène d'occlusion des vaisseaux du xylème par des composés riches en pectine (tyloses et gels) pourrait également entraver la progression des champignons pathogènes par compartimentation [38,143]. En conséquence, les vaisseaux touchés ne sont plus fonctionnels, ce qui conduit à une perte de perméabilité hydraulique (conductivité) des vaisseaux infectés. Par ailleurs, nos résultats attestent que ces perturbations vasculaires sont influencées par les conditions climatiques. Une augmentation de la demande évaporatoire générée par des températures élevées et d'importants déficits en pression de vapeur de l'eau (VPD) contenue dans l'atmosphère, a permis de discriminer plus facilement les ceps sains de ceux malades. En effet, en réponse à de telles conditions environnementales, la transpiration journalière maximale des ceps sains a fortement augmentée alors qu'elle a peu évolué pour les ceps malades.

Les données obtenues à partir des feuilles : conductance stomatique, transpiration foliaire, potentiels hydriques et analyses isotopiques n'ont pas permis de discriminer de façon significative les ceps sains de ceux symptomatiques, avant que les symptômes foliaires d'Esca ne se développent. Pour autant, ces résultats restent compatibles avec les différences mesurées au niveau du flux de sève. Bien que les variations de transpiration soient principalement déterminées par des variations d'ouverture stomatique, la transpiration à l'échelle du cep, est aussi influencée par l'environnement climatique. De ce fait, les variations du flux de sève pourraient ne pas être liées à des variations d'ouverture stomatique, ce dernier ne serait donc pas un bio-indicateur fiable permettant de mesurer, au niveau vasculaire, l'impact du dépérissement à l'Esca chez les ceps infectés.

Afin d'étayer les résultats obtenus au cours de la première étude, une seconde parcelle expérimentale, dont les ceps sont suivis pour les symptômes d'Esca, depuis leur plantation, soit 17 années, a été choisie. L'objectif était d'y suivre les paramètres physiologiques liés au fonctionnement vasculaire de la vigne, décrits dans la première étude et de comparer leur évolution sur deux saisons consécutives, entre des ceps sains et des ceps qui ont exprimé des symptômes foliaires typiques d'Esca. A cette occasion, un second type de capteur a été utilisé, en raison de sa meilleure adaptabilité au modèle vigne.

Pour cette seconde étude, des prélèvements de feuilles saines et symptomatiques, ont été réalisés à différents stades phénologiques clés, et au fur et à mesure de l'augmentation de l'intensité des symptômes foliaires d'Esca. A partir de ces prélèvements, l'expression de gènes impliqués dans de grandes fonctions du métabolisme primaire a été quantifiée par RT-qPCR. Le but était d'identifier des marqueurs génétiques, impliqués dans le dépérissement foliaires des ceps symptomatiques, et de déterminer les fonctions physiologiques les plus impactées comme par exemple le stockage et dégradation des sucres, la photosynthèse, certains mécanismes de défense, et la réponse de la plante au stress.

A l'issue de cette seconde campagne de mesures, menée durant deux saisons consécutives, nos données sont cohérentes avec les résultats décrits dans la première étude. Cependant, la mesure continue de la transpiration des ceps, à partir de capteurs de flux de sève, a été plus longue que précédemment, i.e. 10 et 12 semaines par rapport à 8 semaines pour l'étude 1. Elle a permis de discriminer les ceps sains de ceux symptomatiques, plusieurs

semaines avant que ces derniers n'expriment de symptômes foliaires. En moyenne, le taux de transpiration mesuré chez les ceps symptomatiques était 40 à 50% plus faible que chez les vignes saines. En comparaison à la première étude, la discrimination des ceps a donc été nettement plus marquée.

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les ceps avaient été choisis à partir d'un historique plus long de parcelle, ce qui a permis de sélectionner des ceps témoins plus robustes et des ceps symptomatiques plus représentatifs. De plus, contrairement à l'étude précédente, la meilleure adaptabilité des capteurs au modèle vigne a permis de mesurer les flux de sève de façon non-invasive, directement à la base des rameaux, au plus près des plaies de taille. Les résultats issus de la quantification des nécroses dans le bois des ceps, réalisée à la fin de la campagne de suivi physiologique, attestent de la présence systématique d'une forte proportion d'amadou dans le tronc et les bras des ceps symptomatiques.

Conformément aux résultats de la première étude, les données mesurées au niveau des feuilles : conductance stomatique, activité photosynthétique et composés phénoliques, n'ont pas permis de discriminer les ceps sains de ceux malades, avant que les symptômes foliaires d'Esca ne se développent. Néanmoins, les résultats obtenus à partir des profils d'expression génétique confirment le lien entre les perturbations du métabolisme primaire et l'expression de l'Esca au vignoble. Nos données ont également permis d'identifier un marqueur intéressant de la réponse au stress associé à l'Esca : HSP_Alpha. Les protéines de choc thermique codées par le gène HSP_Alpha permettent aux cellules de résister aux effets néfastes d'une hausse de température. En tant que chaperons moléculaires, les HSP neutralisent la dénaturation et l'agrégation des protéines [262].

Au terme de cette première partie des travaux de thèse, nos résultats montrent qu'en réponse à l'infection, des dysfonctionnements vasculaires sont observés. Ils pourraient être dus à la destruction plus ou moins prononcée des vaisseaux, par exemple lorsque les nécroses se développent dans le tronc ou les cordons, ou qu'ils sont colonisés par les agents pathogènes. La plante peut aussi produire des tyloses et des gels dans les vaisseaux, comme cela a été récemment montré par Bortolami *et al.* (2019) [377]. Il en résulterait une

obstruction des vaisseaux, pouvant être mesurée par les modifications de flux de sève des plants symptomatiques à l'Esca par rapport à ceux qui sont restés sains.

Pour expliquer ce phénomène de dépérissement, l'hypothèse suivante peut aussi être émise : les agents pathogènes de l'Esca coloniseraient le tronc et/ou les rameaux des ceps atteints, et à un moment donné, sans doute sous l'influence d'un facteur environnemental comme le climat et/ou un facteur microbien, e.g. des interactions entre microorganismes, des molécules de type toxines ou métabolites secondaires [143] diffuseraient dans la plante à partir des nécroses, comme l'amadou, via les flux de sève jusqu'aux feuilles [377]. L'accumulation de ces molécules pathogènes dans la canopée engendrerait une cascade de réactions conduisant au développement des symptômes foliaires, caractéristique de l'Esca.

Les deux hypothèses « dysfonctionnements vasculaires » et « éliciteurs/toxines » ne sont pas incompatibles et permettraient d'expliquer l'apparition des symptômes foliaires. Le suivi continu des flux de sève au niveau du tronc a permis d'identifier et de quantifier les dysfonctionnements physiologiques causés par les nécroses, dont les répercussions ont pu être mesurées au niveau de l'activité circulatoire de la plante entière. Le seuil d'occlusion des vaisseaux à partir duquel l'apparition des symptômes deviendrait systématique, reste néanmoins à définir.

La deuxième partie de cette étude a consisté au suivi d'une parcelle sur laquelle deux modes de taille différents sont pratiqués. Selon le mode opérationnel, les opérations de taille peuvent constituer un facteur important de déséquilibre pour la vigne. Chaque plaie va constituer une voie d'entrée privilégiée pour les différents micro-organismes, dont les agents pathogènes, et potentiellement accroître le risque de dépérissement chez les ceps colonisés. L'objectif de ce deuxième volet de la thèse a donc été de vérifier l'intérêt d'une taille censée être « vertueuse », car elle respecterait les trajets de sève et préserverait le fonctionnement vasculaire de la vigne dans la lutte contre l'Esca, par rapport à une taille dite « conventionnelle » plus mutilante pour le cep, qui favoriserait cette maladie.

Afin de vérifier l'hypothèse énoncée ci-avant, dans le cadre du projet GTDfree, une parcelle de démonstration, située sur le domaine Hennessy (région de Cognac, France) a été

mise en place. Cette parcelle, âgée de 10 ans, est plantée avec le cépage Ugni-Blanc. Au début de l'expérimentation, l'état sanitaire général de la parcelle a été réalisé et a montré que très peu de ceps étaient atteints par l'Esca (<1%), ce qui est une condition indispensable pour comparer les deux méthodes de taille.

La première année des suivis physiologiques menés sur la parcelle de démonstration a montré qu'il y avait une grande homogénéité au niveau des ceps. Que ce soit en termes de vigueur, de rendement ou de qualité de production, aucune différence significative n'a été mesurée entre les deux modalités de taille.

L'année suivante un épisode de gel, assez inhabituel pour cette période de l'année, eu lieu en avril 2017. Ceci a fortement perturbé la linéarité dans le déroulement de l'expérimentation. Le gel ayant endommagé les ceps, il a été nécessaire d'effectuer une taille dite de « rattrapage » afin de sauver la production du vignoble, ce qui a retardé d'un an, la mise en place des modalités de taille sur la parcelle.

Néanmoins, suite aux tailles effectuées, les premiers résultats obtenus au niveau des cônes de dessiccations (par C. Cholet, dans le cadre du projet GTDfree) semblent confirmer l'hypothèse selon laquelle la taille censée être « vertueuse » et respectueuse des flux de sève limiterait la formation de bois mort dans le cep. Les travaux de C. Cholet ont montré que la présence d'un diaphragme au-dessus de la plaie permettrait d'éviter l'extension de la zone de cicatrisation aux vaisseaux du rameau porteur. Les flux de sève y seraient donc nettement moins perturbés qu'avec la taille dite « conventionnelle » ou ce phénomène n'a pas été observé. Cependant, ces résultats devront être confirmés dans le cadre du projet GTDfree qui va se poursuivre durant plusieurs années.

Le point clé pour comprendre pourquoi un tissu de bois sain va se nécroser chez des ceps matures consiste à déterminer les facteurs favorisant l'activité pathogène des champignons, voire d'autres microorganismes tels que les bactéries, et leur aptitude à dégrader les tissus du bois. Les pratiques culturales comme la taille et son influence indirecte pour favoriser, ou au contraire limiter, le développement des agents pathogènes de l'Esca constituent un facteur dont le rôle doit être précisément démontré. La demande pour des références sanitaires et techniques généralisables et applicables de la part de la profession viticole est en effet très forte. Ayant cette idée comme ligne directrice, la présente expérimentation avait été initiée. Cependant lorsqu'elle a débuté nous étions conscients qu'il

serait difficile d'observer des différences nettes entre les deux catégories de ceps (i.e. taillés différemment) au niveau de leur physiologie ou des nécroses dans le bois durant un laps de temps relativement court pour ce type de maladie due à une destruction lente du bois, i.e. trois années. Néanmoins nous espérons voir des débuts de différenciation entre les deux catégories de ceps au niveau de leur physiologie. La tâche s'est compliquée lorsqu'en 2017 les ceps ont subi le gel.

Dans ce contexte, le bilan que nous pouvons faire est le suivant : pour l'instant, les paramètres suivis sont homogènes pour tous les ceps, il n'y a pas de différences au niveau des symptômes foliaires d'Esca chez les deux types de ceps. Les vignes sont quasiment toutes asymptomatiques et les paramètres physiologiques mesurés ne sont pas différents. D'un côté, cela confirme que des différences pour ce type de marqueurs ne seront obtenues qu'au niveau du temps moyen (i.e. paramètres physiologiques) ou long (i.e. symptômes foliaires). Par contre, une différenciation semble s'établir au niveau des cônes de dessiccation, dont la dangerosité pour les flux de sève semble plus conséquente pour la modalité taille « conventionnelle » par rapport à celle dite « vertueuse ». L'installation de capteurs de flux de sève identiques à ceux présentés dans l'article 2 du Chapitre 2, a été effectuée pour la première fois sur cette parcelle au cours de l'été 2019. Les éventuelles premières variations pourront être mesurées dans la suite de l'essai qui est prévu pour durer sur le temps long.

III. Perspectives

Les facteurs menant au développement des symptômes foliaires de MDB chez les vignes font l'objet de nombreuses discussions [386]. Ceux-ci incluent l'implication possible de substances phytotoxiques [143] produites par les agents pathogènes, un rôle important des facteurs environnementaux, en particulier la disponibilité en eau [376], et un dysfonctionnement vasculaire général déclenché par des pratiques culturelles inappropriées [8]. Quelles que soient les causes, probablement une combinaison de ces facteurs, des auteurs ont démontré une altération radicale des fonctions photosynthétiques ainsi que des réponses de défense stimulantes des vignes touchées plusieurs jours avant l'apparition des premiers symptômes foliaires [208,244,247]. La détection précoce d'une maladie est

importante dans les études sur le développement des symptômes et dans l'évaluation de l'efficacité des stratégies de contrôle disponibles [243,335]. La détection précoce peut également aider à comprendre les facteurs qui incitent au développement des symptômes, ce qui permet de prévenir les pertes de rendement et de qualité.

Pour l'Esca, malgré l'absence de méthodes de lutte préventive ou curative ayant un haut niveau d'efficacité, la détection précoce des vignes symptomatiques pourrait améliorer l'efficacité de la gestion des vignobles par rapport à cette maladie [231,282,331].

Avec cet angle d'approche, et suite aux résultats obtenus dans cette thèse, trois points sont à considérer et pourraient ouvrir des perspectives de recherche utiles pour lutter contre l'Esca :

1. Des réponses sur des bio-indicateurs clés liées au métabolisme de la vigne, ainsi qu'au stress physiologique généré par l'Esca, ont été obtenues. La discrimination entre ceps sains et symptomatiques, basée sur le suivi d'indicateurs foliaires n'est cependant pas pertinente pour une détection précoce. En effet les différences ne sont devenues significatives qu'au moment, ou à la suite, de l'expression des premiers symptômes. **Au contraire, la méthode développée à partir de la mesure des flux de sève s'est avérée efficace dans la détection des ceps symptomatiques, plusieurs semaines avant l'apparition des symptômes foliaires.** Ainsi, à l'avenir, le suivi des flux de sève pourrait devenir un outil pertinent dans le cadre d'un outil de détection précoce de l'Esca. On peut cependant objecter qu'actuellement, pour l'Esca, même si une détection plusieurs semaines avant l'apparition des symptômes est possible, aucune méthode de lutte efficace ne pourrait être appliquée pour guérir ces ceps. Néanmoins, si l'on se place dans la perspective positive d'une recherche ayant trouvé un moyen de guérison de ces ceps, les flux de sève auront toute leur place et pertinence.
2. Lorsque la thèse a été initiée, nous souhaitions répondre à un problème, toujours irrésolu, qui concerne les ceps symptomatiques l'année n, puis asymptomatiques l'année n+1. L'idée était de déterminer dans quelle mesure ces ceps, devenus asymptomatiques, avaient été affectés, ou non, au niveau des paramètres physiologiques mesurés, particulièrement les flux de sève. Il n'a pas été possible

d'acquérir des données solides, le nombre de cas observés dans nos expérimentations ayant été trop faible. Une future expérimentation impliquant un nombre de ceps beaucoup plus élevé, et connus au niveau de leur passé pathologique, pourrait être mise en place pour répondre à ce questionnement. Il sera alors possible de déterminer l'efficacité de la résilience des ceps, en particulier de ceux qui redeviendront symptomatiques l'année n+2, en comparaison à ceux qui resteront asymptomatiques.

3. La présence typique et obligatoire de l'amadou chez les ceps symptomatiques à l'Esca a aussi été mise en évidence. Dans le cadre de cette thèse, la valeur seuil de 10%, au moins, d'amadou chez les ceps est liée à l'apparition de symptômes foliaires d'Esca. De récents travaux ont également montré que lorsque l'amadou est enlevé par curetage, un nombre très important de ceps redeviennent sains [387].

Ainsi il apparaît qu'étudier le lien entre une nécrose interne spécifique de l'Esca, via la formation et le développement de l'amadou, et les nécroses externes, via les feuilles tigrées typiques de l'Esca, semble une voie d'étude intéressante pour connaître, mais aussi pour lutter contre cette maladie. On peut aussi émettre l'hypothèse que l'interaction, ainsi que le lien, entre ces deux catégories de symptômes se ferait au niveau des flux de sève qui constitueraient donc un site d'étude privilégié pour cette maladie.

En somme, les voies de recherche apportées dans ce travail sont à approfondir, notamment *in planta*, mais elles constituent un socle solide dans l'approfondissement des connaissances sur l'Esca et la recherche de stratégies de lutte efficaces.

Collaborations et valorisation des travaux

I. 1. Collaborations

Les travaux présentés dans cette thèse ont pu être réalisés grâce à différentes collaborations.

Collaboration avec M. Pierre Darriet, directeur d'exploitation du Château Luchey-Halde, et son équipe, pour la réalisation des expérimentations.

Collaboration avec M. Aurélien Berthoud et Mme Delphine Preterre de la société Fruition Sciences, pour l'installation de capteurs de flux de sève, et la mise à disposition d'une plateforme web permettant de surveiller en continu la qualité des données enregistrées.

Collaboration avec la Pr. Florence Fontaine et son équipe au sein de l'UMR RIBP (Résistance Induite et Bioprotection des Plantes), de l'Université de Reims Champagne Ardenne (France), pour la réalisation des expérimentations RT-qPCR et l'analyse des profils d'expression génétiques obtenus.

Collaboration avec Jas Hennessy & Co dans le cadre de la chaire industrielle « GTDfree », pour la mise en place d'une parcelle de démonstration, et le suivi de l'impact d'une taille respectueuse des flux de sève sur la physiologie de la vigne.

Collaboration avec la Dr. Céline Cholet et la Dr. Emilie Buez de l'UR Œnologie rattachée à l'Université de Bordeaux, à l'INRA et à Bordeaux INP, pour le suivi d'indicateurs physiologiques sur la parcelle de démonstration, mise en place dans le cadre de la chaire industrielle « GTDfree ».

II. 2. Valorisation scientifique des résultats de la thèse

II.1. Publications internationales à comité de lecture

Ouadi L, Bruez E, Bastien S, Vallance J, Lecomte P, Domec JC, Rey P. **Ecophysiological impacts of Esca, a devastating grapevine trunk disease, on *Vitis vinifera* L.** *Plos One*. 2019 ; 14(9): e0222586.

Ouadi L, Bruez E, Bastien S, Coppin C, Yacoub A, Fontaine F, Domec JC, Rey P. **Assessment of sap flow disruption related with the physiological and genetic responses following Esca infection of *Vitis vinifera* L.**

Soumission en cours

II.2. Communications orales lors de congrès

Ouadi L, Bruez E, Bastien S, Domec JC, Rey P. 2017. Highlights on ecophysiological changes in Esca diseased grapevines in comparison to healthy plants. 10th International World congress on GTD, 4-7 juillet 2017, Reims, France.

Ouadi L. 2018. Ecophysiological impacts of esca, a devastating grapevine trunk disease, on *Vitis vinifera* L. Journée Maladies du bois, 29-31 octobre 2018, Dijon.

II.3. Communication par posters lors de congrès

Ouadi L, Bruez E, Delmas C, Bastien S, Lecomte P, Domec JC, Rey P. 2019. Ecophysiological shifts induced by Esca disease on *Vitis vinifera* L. 11th International World congress on GTD, 7-12 juillet 2019, British Columbia, Canada.

Benetreau C, Lecomte C, Diarra B, Vallance J, Dufour MC, Couture C, Ouadi L, Bruez E, Delmas C, Boisseau M, Weingartner S, Rey P. 2019. Esca and training systems in the viticulture region of Charentes, France. 11th International World congress on GTD, 7-12 juillet 2019, British Columbia, Canada.

Références bibliographiques

1. BIPE. Rapport final de la mission FAM-CNIV-BIPE. *Bureau d'Informations et de Prévisions Economiques* [en ligne]. 2015. Disponible sur: <https://www.plan-deperissement-vigne.fr/presentation-du-plan/rapport-final-du-bipe> [Consulté le 15 juillet 2019].
2. Valtaud C, Larignon P, Roblin G, Fleurat-Lessard P. 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*. 2009; 91(1): 37–51.
3. Wagschal I, Abou-Mansour E, Petit A, Clément C, Fontaine F. Wood diseases of grapevine: a review on eutypa dieback and Esca. *Plant-Microbe Interactions*. 2008: 367–391.
5. Bruez E, Lecomte P, Grosman J, Doublet B, Bertsch C, Fontaine F, *et al.* Overview of grapevine trunk diseases in France in the 2000s. *Phytopathologia Mediterranea*. 2013; 52: 262-275.
6. Lorrain B, Ky I, Pasquier G, Jourdes M, Dubrana LG, Geny L, *et al.* Effect of Esca disease on the phenolic and sensory attributes of Cabernet Sauvignon grapes, musts and wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2012; 18(1): 64-72.
7. Larignon P, Fontaine F, Bertsch C. Les maladies du bois de la vigne: l'arsénite de sodium de nouveau à l'étude. *Le vigneron champenois*. 2014; 135(10): 27–29.
8. Lecomte P, Diarra B, Carbonneau A, Rey P, Chevrier C. Esca of grapevine and training practices in France: results of a 10-year survey. *Phytopathologia Mediterranea*. 2018; 57(3): 472-487.
9. IPCC, 2018: global warming of 1.5°C. *An IPCC special report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty* [online]. 2018. Available from: <https://www.ipcc.ch/sr15/> [Accesed July 15 2019].
10. Chadefaud M, Emberger L. *Traité de botanique systématique*. Masson [en ligne]. 1960. Disponible sur: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300319810> [Consulté le 15 juillet 2019].
11. Galet P. *Dictionnaire encyclopédique des cépages*. Hachette [en ligne]. 2000. Disponible sur: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300056415> [Consulté le 15 juillet 2019].
12. Ren H, Lu LM, Soejima A, Luke Q, Zhang DX, Chen ZD, *et al.* Phylogenetic analysis of the grape family (Vitaceae) based on the noncoding plastid trnC-petN, trnH-psbA, and trnL-F sequences. *Taxon*. 2011; 60(3): 629–637.
13. Mullins MG, Bouquet A, Williams LE. *Biology of the grapevine*. Biology of the grapevine. *Cambridge University Press* [online]. 1992: 239. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19920316870> [Accesed July 15 2019].
14. The Plant List. Version 1.1 [online]. 2013. Available from: <http://www.theplantlist.org/> [Accesed July 15 2019].
15. Planchon JE. *Monographie des Ampelidees vraies*. *Monographiae Phanerogamarum*. 1887; 5: 452.
16. Wan Y, Wang Y, Li D, He P. Evaluation of agronomic traits in Chinese wild grapes and screening superior accessions for use in a breeding program. *Vitis: Journal of Grapevine Research*. 2008; 47(3): 153–158.
17. Levadoux L. *Les populations sauvages et cultivées des Vitis vinifera L.* *Institut National de la Recherche Agronomique*. 1956.
18. Reynier A. *Manuel de viticulture: guide technique du viticulteur*. Lavoisier. 2011: 611.
19. This P, Lacombe T, Thomas MR. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*. 2006; 22(9): 511–519.
20. Lebon G, Wojnarowicz G, Holzapfel B, Fontaine F, Vaillant-Gaveau N, Clement C. Sugars

- and flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Experimental Botany*. 2008; 59(10): 2565-2578.
21. Baggiolini M. Stades repères de la vigne. *Station Fédérale d'Essais et de Contrôle de Semences*. 1952.
 22. Eichhorn KW, Lorenz HK, Phänologische Entwicklungsstadien der Rebe. *Der Deutsche Weinbau*. 1977.
 23. Huglin P, Schneider C. Biologie et écologie de la vigne. *Lavoisier*. 1998.
 24. OIV 2019. OIV. *Note de conjoncture mondiale* [en ligne]. Disponible sur <http://www.oiv.int/fr/normes-et-documents-techniques/analyses-statistiques/analyse-conjoncturelle> [Consulté le 15 Juillet 2019].
 25. FAO 2017. FAO. FAOSTAT, FAO Statistic Division. *Food and Agriculture Organization of the United Nations* [en ligne]. Disponible sur: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> [Consulté le 15 juillet 2019].
 26. OIV 2018. OIV. *OIV Statistical Report on World Vitiviniculture* [en ligne]. Disponible sur: <http://oiv.int/fr/normes-et-documents-techniques/analyses-statistiques/situation-annuelle> [Consulté le 15 juillet 2019].
 27. FAM 2018. FAM. *Fiches produits vin FranceAgriMer* [en ligne]. Disponible sur: <https://www.franceagrimer.fr/filieres-Vin-et-cidre/Vin/La-filiere-Vin> [Consulté le 15 juillet 2019].
 28. FEVS 2019. FEVS. Bilan des exportations de vins et spiritueux 2018. *Fédération des Exportateurs de Vin et Spiritueux de France* [en ligne]. Disponible sur: <https://www.fevs.com/presse/> [Consulté le 15 juillet 2019].
 29. Atout France. Tourisme et vin. *Les clientèles françaises et internationales, les concurrents de la France*. 2010.
 30. Aubertot JN, Barbier JM, Carpentier A, Gril JN, Guichard L, Lucas P, *et al.* Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux. *Expertise Scientifique Collective Inra-Cemagref*. 2007.
 31. Cooper M, Varela L, Smith R, Whitmer D, Simmons G, Lucchi A, *et al.* Managing newly established pests: growers, scientists and regulators collaborate on European grapevine moth program. *California Agriculture*. 2014; 68(4): 125–133.
 32. Jacquet F, Butault JP, Guichard L. An economic analysis of the possibility of reducing pesticides in French field crops. *Ecological Economics*. 2011; 70(9): 1638–1648.
 33. Giuliano S, Ryan MR, Véricel G, Rametti G, Perdrieux F, Justes E, *et al.* Low-input cropping systems to reduce input dependency and environmental impacts in maize production: a multi-criteria assessment. *European Journal of Agronomy*. 2016; 76: 160–175.
 34. Agreste 2019. Agreste. *Enquête pratiques phytosanitaires en viticulture en 2016: nombre de traitements et indicateurs de fréquence de traitement* [en ligne]. Disponible sur: <http://agreste.agriculture.gouv.fr/publications/dossiers/article/enquete-pratiques-phytosanitaires-15027> [Consulté le 15 juillet 2019].
 35. Butault JP, Delame N, Jacquet F, Rio P, Zardet G, Benoit M, *et al.* Ecophyto R&D. Vers des systèmes de culture économes en pesticides. Volet 1. Tome VI: analyse *ex ante* de scénarios de rupture dans l'utilisation des pesticides. *Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement Durable et de la Mer*. 2009: 90.
 36. Martelli GP. Infectious diseases and certification of grapevine. *Options Méditerranéennes Serie B*. 1997; 29: 47-64.
 37. Compant S, Brader G, Muzammil S, Sessitsch A, Lebrühi A, Mathieu F. Use of beneficial bacteria and their secondary metabolites to control grapevine pathogen diseases. *BioControl*. 2013; 58(4): 435–455.
 38. Mugnai L, Graniti A, Surico G. Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant disease*. 1999; 83: 404-418.
 39. Agusti-Brisach C, Armengol J. Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies. *Phytopathologia Mediterranea*. 2013: 245-261.
 40. Carlucci A, Cibelli F, Lops F, Phillips AJ, Ciccarone C, Raimundi ML. *Pleurostomophora richardsiae* associated with trunk diseases of grapevines in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea*. 2015: 109-123.
 41. Cloete M, Fischer M, Mostert L, Halleen F. Hymenochaetales associated with Esca-related

- wood rots on grapevine with a special emphasis on the status of Esca in South African vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*. 2015; 299-312.
42. Gramaje D, Armengol J. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant Disease*. 2011; 95(9): 1040–1055.
 43. Gramaje D, Mostert L, Groenewald JZ, Crous PW. *Phaeoacremonium*: from Esca disease to phaeohyphomycosis. *Fungal Biology*. 2015; 119: 759-783.
 44. Lawrence DP, Travadon R, Pouzoulet J, Rolshausen PE, Wilcox WF, Baumgartner K. Characterization of Cytospora isolates from wood cankers of declining grapevine in North America, with the descriptions of two new Cytospora species. *Plant Pathology*. 2017; 66(5): 713–725.
 45. Travadon R, Lawrence DP, Rooney-Latham S, Gubler WD, Wilcox WF, Rolshausen PE, *et al.* Cadophora species associated with wood-decay of grapevine in North America. *Fungal Biology*. 2015; 119(1): 53–66.
 46. Trouillas FP, Urbez-Torres JR, Gubler WD. Diversity of diatrypaceous fungi associated with grapevine canker diseases in California. *Mycologia*. 2010; 102(2): 319–336.
 47. Urbez-Torres JR. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*. 2011; 50(4): 5.
 48. Urbez-Torres JR, Peduto F, Smith RJ, Gubler WD. Phomopsis dieback: a Grapevine Trunk Disease caused by *Phomopsis viticola* in California. *Plant Disease*. 2013; 97(12): 1571–1579.
 49. Gramaje D, Urbez-Torres JR, Sosnowski MR. Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. *Plant Disease*. 2018;102(1): 12-39.
 50. Makatini GJ. The role of sucker wounds as portals for grapevine trunk pathogen infections (Doctoral dissertation, Stellenbosch: Stellenbosch University). 2014. Available from: <https://scholar.sun.ac.za:443/handle/10019.1/86599>
 51. Waite H, Whitelaw-Weckert M, Torley P. Grapevine propagation: principles and methods for the production of high-quality grapevine planting material. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 2015; 43(2): 144–161.
 52. Decoin M. Grapevine products: news on withdrawals and restrictions. *Phytoma La Défense des Végétaux*. 2001.
 53. Gramaje D, Baumgartner K, Halleen F, Mostert L, Urbez-Torres JR, Armengol J. Fungal trunk diseases: a problem beyond grapevines? *Plant Pathology*. 2016; 65(3): 355–356.
 54. Kaplan J, Travadon R, Cooper M, Hillis V, Lubell M, Baumgartner K. Identifying economic hurdles to early adoption of preventative practices: the case of trunk diseases in California winegrape vineyards. *Wine Economics and Policy*. 2016; 5(2): 127–141.
 55. Pitt WM, Huang R, Steel CC, Savocchia S. Pathogenicity and epidemiology of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevines in Australia. *Australasian Plant Pathology*. 2013; 42(5): 573–582.
 56. Pitt WM, Urbez-Torres JR, Trouillas FP. *Dothiorella vidmadera*, a novel species from grapevines in Australia and notes on *Spencermartinsia*. *Fungal Diversity*. 2013; 61(1): 209–219.
 57. Pitt WM, Urbez-Torres JR, Trouillas FP. *Dothiorella* and *Spencermartinsia*, new species and records from grapevines in Australia. *Australasian Plant Pathology*. 2015; 44(1): 43–56.
 58. Rolshausen PE, Akgul DS, Perez R, Eskalen A, Gispert C. First report of wood canker caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on grapevine in California. *Plant Disease*. 2013; 97(11): 1511.
 59. Yang T, Groenewald JZ, Cheewangkoon R, Jami F, Abdollahzadeh J, Lombard L, *et al.* Families, genera, and species of Botryosphaeriales. *Fungal Biology*. 2017; 121(4): 322–346.
 60. Larignon P, Dubos B. Fungi associated with Esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*. 1997; 103: 147-157.
 61. Urbez-Torres JR, Leavitt GM, Guerrero JC, Guevara J, Gubler WD. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease*. 2008; 92(4): 519–529.
 62. Urbez-Torres JR, Gubler WD. Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevine cankers in California. *Plant Disease*. 2009; 93(6): 584–592.
 63. van Niekerk JM, Crous PW, Groenewald JZ, Fourie PH, Halleen F. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of Botryosphaeria species on grapevines. *Mycologia*. 2004; 96(4):

781-798.

64. van Niekerk JM, Calitz FJ, Halleen F, Fourie PH. Temporal spore dispersal patterns of grapevine trunk pathogens in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*. 2010; 127(3): 375–390.
65. Urbez-Torres JR, Battany M, Bettiga LJ, Gispert C, McGourty G, Roncoroni J, *et al.* Botryosphaeriaceae species spore-trapping studies in California vineyards. *Plant Disease*. 2010; 94(6): 717–724.
66. Urbez-Torres JR, Bruez E, Hurtado J, Gubler WD. Effect of temperature on conidial germination of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Plant Disease*. 2010; 94(12): 1476–1484.
67. Kuntzmann P, Villaume S, Bertsch C. Conidia dispersal of *Diplodia* species in a French vineyard. *Phytopathologia Mediterranea*. 2009;48(1): 150-154.
68. Leavitt GMJ. The occurrence, distribution, effects and control of *Botryodiplodia theobromae* on *Vitis vinifera* in California, Arizona and northern Mexico (Doctoral dissertation Riverside, University of California). 1991.
69. Urbez-Torres JR, Leavitt GM, Voegel TM, Gubler WD. Identification and distribution of Botryosphaeria spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease*. 2006; 90(12): 1490–1503.
70. Wilcox WF, Gubler WD, Uyemoto JK. Compendium of grape diseases, disorders, and pests. *The American Phytopathological Society*. 2015.
71. Tulasne LR, Tulasne C. *Selecta Fungorum Carpologia, 2. Imperial*. 1863.
72. Rappaz F. Taxonomy and nomenclature of *Diatrype stigma*, *Diatrype decorticata* and *Diatrype undulata* (Diatrypaceae, Ascomycetes). *Mycotaxon*. 1987.
73. Carter MV. The status of *Eutypa lata* as a pathogen. *CAB International*. 1991.
74. Bernard AC, Mur G. Les sites de presence sur la souche du mycelium d'*Eutypa lata*, agent causal de l'eutypiose de la Vigne. *Le Progres Agricole et Viticole*. 1986; 103(11): 288-289.
75. Molyneux RJ, Mahoney N, Bayman P, Wong RY, Meyer K, Irelan N. *Eutypa* dieback in grapevines: differential production of acetylenic phenol metabolites by strains of *Eutypa lata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50(6): 1393–1399.
76. Moller WJ, Kasimatis AN. Dieback of grapevines caused by *Eutypa armeniacae*. *Plant Disease Reporter*. 1978; 62(3): 254–258.
77. Philippe I, Fallot J, Petitprez M, Dargent R. Effets de l'eutypiose sur des feuilles de *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon. Etude cytologique. *Vitis*. 1992; 31(1): 45-53.
78. Carter MV. *Eutypa* dieback ('Dying arm') disease of grapevines. *Australian Grapegrower and Winemaker*. 1978.
79. Tey-Rulh P, Philippe I, Renaud JM, Tsoupras G, de Angelis P, Fallot J, *et al.* Eutypine, a phytotoxin produced by *Eutypa lata* the causal agent of dying-arm disease of grapevine. *Phytochemistry*. 1991; 30(2): 471–473.
80. Sosnowski MR, Shtienberg D, Creaser ML, Wicks TJ, Lardner R, Scott ES. The Influence of climate on foliar symptoms of *Eutypa* dieback in grapevines. *Phytopathology*. 2007; 97(10): 1284–1289.
81. Moller WJ, Kasimatis AN, Kissler JJ. A dying arm disease of grape in California (*Eutypa armeniacae*). *Plant Disease Reporter*. 1974; 58.
82. Viala P. Recherches sur les maladies de la vigne: Esca. *Annales des Epiphyties*. 1926; 12: 1-108.
83. Crous PW, Gams W, Wingfield MJ, van Wyk PS. *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections. *Mycologia*. 1996; 88(5): 786–796.
84. Crous PW, Gams W. *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and Esca. *Phytopathologia Mediterranea*. 2000; 39: 112-118.
85. Fischer M, Kassemeyer HH. Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany. *Vitis-Geilweilerhof*. 2003; 42(3): 109-116.
86. Fischer M. A new wood-decaying basidiomycete species associated with Esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). *Mycological Progress*. 2002; 1(3): 315-324.
87. Edwards J, Marchi G, Pascoe IG. Young Esca in Australia. *Phytopathologia Mediterranea*.

2001; 40: 303–310.

88. Groenewald M, Kang JC, Crous PW, Gams W. ITS and β -tubulin phylogeny of *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* species. *Mycological Research*. 2001; 105(6): 651–657.
89. Essakhi S, Mugnai L, Crous PW, Groenewald JZ, Surico G. Molecular and phenotypic characterisation of novel *Phaeoacremonium* species isolated from Esca diseased grapevines. *Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. 2008; 21: 119.
90. Gramaje D, Garcia-Jimenez J, Armengol J. Field evaluation of grapevine rootstocks inoculated with fungi associated with Petri disease and Esca. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2010; 61(4): 512-520.
91. Mostert L, Crous PW, Groenewald JZ, Gams W, Summerbell RC. Togninia (Calosphaeriales) is confirmed as teleomorph of *Phaeoacremonium* by means of morphology, sexual compatibility and DNA phylogeny. *Mycologia*. 2003; 95(4): 646-659.
92. Eskalen A, Gubler WD, Khan A. Rootstock susceptibility to *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. *Phytopathologia Mediterranea*. 2001; 40: 433–438.
93. Larignon P, Dubos B. Preliminary studies on the biology of *Phaeoacremonium*. *Phytopathologia Mediterranea*. 2000; 39(1): 184–189.
94. Rooney-Latham S, Eskalen A, Gubler WD. Occurrence of *Togninia minima* perithecia in Esca-affected vineyards in California. *Plant Disease*. 2005; 89(8): 867–871.
95. Feliciano AJ, Gubler WD. Histological investigations on infection of grape roots and shoots by *Phaeoacremonium* spp. *Phytopathologia Mediterranea*. 2001; 40: 387–393.
96. Troccoli L, Mugnai L, Surico G, Calamassi R, Mori B. *Phaeomoniella chlamydospora*-grapevine interaction. Histochemical reactions to fungal infection (*Vitis vinifera* L.). *Phytopathologia Mediterranea*. 2001; 40: 400-406.
97. Bruno G, Sparapano L, Graniti A. Effects of three Esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: IV. Diffusion through the xylem of metabolites produced by two tracheiphilous fungi in the woody tissue of grapevine leads to Esca-like symptoms on leaves and berries. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2007; 71(1): 106–124.
98. Larignon P, Fontaine F, Farine S, Clement C, Bertsch C. Esca et Black Dead Arm : deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la Vigne. *Comptes rendus - Biologies*. 2009; 9(332): 765–783.
99. Fourie PH, Halleen F. Investigation on the occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* in canes of rootstock mother vines. *Australasian Plant Pathology*. 2002; 31(4): 425-426.
100. Halleen F, Crous RW, Petrin O. Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. *Australasian Plant Pathology*. 2003; 32(1): 47-52.
101. Whiteman SA, Stewart A, Ridgway HJ, Jaspers MV. Infection of rootstock mother-vines by *Phaeomoniella chlamydospora* results in infected young grapevines. *Australasian Plant Pathology*. 2007; 36(2): 198-203.
102. Ridgway HJ, Sleight BE, Stewart A. Molecular evidence for the presence of *Phaeomoniella chlamydospora* in New Zealand nurseries, and its detection in rootstock mothervines using species-specific PCR. *Australasian Plant Pathology*. 2002; 31(3): 267-271.
103. Aroca A, Gramaje D, Armengol J, Garcia-Jimenez J, Raposo R. Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *European Journal of Plant Pathology*. 2010; 126(2): 165–174.
104. Bertelli E, Mugnai L, Surico G. Presence of *Phaeoacremonium chlamydosporum* in apparently healthy rooted grapevine cuttings. *Phytopathologia Mediterranea*. 1998; 37(2): 79-82.
105. Gimenez- Jaime A, Aroca A, Raposo R, Garcia- Jimenez J, Armengol J. Occurrence of fungal pathogens associated with grapevine nurseries and the decline of young vines in Spain. *Journal of Phytopathology*. 2006; 154(10): 598-602.
106. Bruez E, Vallance J, Gerbore J, Lecomte P, Da Costa JP, Guerin-Dubrana L, et al. Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of Esca leaf-symptomatic and asymptomatic vines. *Plos One*. 2014; 9(5): e95928.
107. Romanazzi G, Murolo S, Pizzichini L, Nardi S. Esca in young and mature vineyards, and molecular diagnosis of the associated fungi. *European Journal of Plant Pathology*. 2009; 125(2):

277–290.

108. Dubos B. Le syndrome de l'Esca. Maladies cryptogamiques de la vigne. *Feret*. 2002: 127-136.
109. Aenaud G, Arnaud M. Treatise on plant pathology. *Paul Lechevalier et Fils*. 1931.
110. Chiarappa L. Wood decay of the Grapevine and its relationship with black measles disease. *Phytopathology*. 1959; 49(8): 510-519.
111. Rumbos I, Rumbou A. Fungi associated with Esca and young grapevine decline in Greece. *Phytopathologia Mediterranea*. 2001; 40: 330–335.
112. Maher N, Piot J, Bastien S, Vallance J, Rey P, Guerin-Dubrana L. Wood necrosis in Esca-affected vines: types, relationships and possible links with foliar symptom expression. *Oeno One*. 2012; 46(1): 15-27.
113. Lecomte P, Darrietort G, Liminana JM, Comont G, Muruamendiaraz A, Legorburu FJ, *et al*. New insights into Esca of grapevine: the development of foliar symptoms and their association with xylem discoloration. *Plant Disease*. 2012; 96(7): 924-934.
114. Bruez E, Vallance J, Gerbore J, Lecomte P, Guerin-Dubrana L, Rey P. Characterization of endophytic microflora colonizing wood tissues of healthy and Esca-diseased vines. *Phytopathology*. 2011; 101(6): 21.
115. Graniti A. Il “mal dell’Esca” della vite in Puglia. *Italia Agricola*. 1960; 97: 543-550.
116. Grasso S. Il «mal dell’Esca» della vite (*Phellinus igniarius* Pat.) in Sicilia. *Tecnica Agricola*. 1969; 21: 3-11.
117. Surico G, Marchi G, Braccini P, Mugnai L. Epidemiology of Esca in some vineyards in Tuscany (Italy). *Phytopathologia Mediterranea*. 2000; 39(1): 190-205.
118. Sparapano L, Bruno G, Ciccarone C, Graniti A. Infection of grapevines by some fungi associated with Esca. I. *Fomitiporia punctata* as a wood-rot inducer. *Phytopathologia Mediterranea*. 2000; 39(1): 46–52.
119. Bruez E. 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, Bordeaux: Université de Bordeaux 2). 2013. Available from: <http://www.theses.fr/2013BOR22027>
120. Bruez E, Baumgartner K, Bastien S, Travadon R, Guerin-Dubrana L, Rey P. Various fungal communities colonise the functional wood tissues of old grapevines externally free from grapevine trunk disease symptoms. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2016; 22(2): 288-295.
121. Travadon R, Lecomte P, Diarra B, Lawrence DP, Renault D, Ojeda H, *et al*. Grapevine pruning systems and cultivars influence the diversity of wood-colonizing fungi. *Fungal Ecology*. 2016; 24: 82–93.
122. Bruez E, Larignon P, Compant S, Rey P. Investigating the durable effect of the hot water treatment used in nurseries on pathogenic fungi inhabiting grapevine wood and involved in Grapevine Trunk Diseases. *Crop Protection*. 2017; 100: 203–210.
123. Bruez E, Haidar R, Alou MT, Vallance J, Bertsch C, Mazet F, *et al*. Bacteria in a wood fungal disease: characterization of bacterial communities in wood tissues of esca-foliar symptomatic and asymptomatic grapevines. *Frontiers in Microbiology*. 2015; 6: 1137.
124. Del Frari G, Gobbi A, Aggerbeck MR, Oliveira H, Hansen LH, Ferreira RB. Characterization of the wood mycobiome of *Vitis vinifera* in a vineyard affected by Esca. Spatial distribution of fungal communities and their putative relation with leaf symptoms. *Frontiers in Plant Science*. 2019; 10: 910.
125. Nerva L, Zanzotto A, Gardiman M, Gaiotti F, Chitarra W. Soil microbiome analysis in an Esca diseased vineyard. *Soil Biology and Biochemistry*. 2019; 135: 60-70.
126. Larignon P. Maladies cryptogamiques du bois de la vigne: symptomatologie et agents pathogènes [en ligne]. 2016. Disponible sur: https://www.vignevin.com/wp-content/uploads/2018/12/maladiesduboisdelavigne_janv2016.pdf [Consulté le 10/09/2019]
127. Ravaz L. Sur le folletage. *Revue de Viticulture*. 1898; 10: 184-186.
128. Viala P. L’apoplexie. *Bulletin de la Societe de Pathologie Vegetale de France IX*. 1922.
129. Grosman J, Doublet B. Maladies du bois de la vigne: synthèse des dispositifs d’observation au vignoble, de l’observatoire 2003-2008 au réseau d’épidémiosurveillance actuel. *Phytoma La Défense des Végétaux*. 2012; (651): 31-35.
130. Kobes N. Maladies du bois. L’Observatoire national dresse le bilan. *Viti: de la vigne au vin*. 2006; 30(321): 36–37.

131. Surico G. Towards commonly agreed answers to some basic questions on Esca. *Phytopathologia Mediterranea*. 2001; 40: 487–490.
132. Surico G. Towards a redefinition of the diseases within the Esca complex of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*. 2009; 48(1): 5–10.
133. Morton L. Mystery diseases hit young vines. *Wines and vines*. 1995; 76(11): 46–47.
134. Scheck HJ, Vasquez SJ, Gubler WD, Fogle D. First report of three *Phaeoacremonium* spp. causing young grapevine decline in California. *Plant Disease*. 1998; 82(5): 590.
135. Pascoe I, Cottral E. Developments in grapevine trunk diseases research in Australia. *Phytopathologia Mediterranea*. 2000; 39(1): 68–75.
136. Gubler WD, Baumgartner K, Browne GT, Eskalen A, Latham SR, Petit E, *et al.* Root diseases of grapevines in California and their control. *Australasian Plant Pathology*. 2004; 33(2): 157–165.
137. Serra S, Borgo M, Zanzotto A. Investigation into the presence of fungi associated with Esca of young vines. *Phytopathologia Mediterranea*. 2000; 39(1): 21–25.
138. Peros JP, Berger G, Jamaux- Despreaux I. Symptoms, wood lesions and fungi associated with Esca in organic vineyards in Languedoc- Roussillon (France). *Journal of Phytopathology*. 2008; 156(5): 297–303.
139. Eskalen A, Feliciano AJ, Gubler WD. Susceptibility of grapevine pruning wounds and symptom development in response to infection by *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora*. *Plant Disease*. 2007; 91(9): 1100–1104.
140. Del Rio J, Gonzalez A, Fuster MD, Ortuno A, Gomez P, Frias V, *et al.* Tylose formation and changes in phenolic compounds of grape roots infected with *Phaeomoniella Chlamydospora* and *Phaeoacremonium* species. *Phytopathologia Mediterranea*. 2001; 40(3): 1000–1006.
141. Edwards J, Pascoe IG, Salib S. Impairment of grapevine xylem function by *Phaeomoniella chlamydospora* infection is due to more than physical blockage of vessels with “goo”. *Phytopathologia Mediterranea*. 2007; 46(1): 87–90.
142. Pouzoulet J, Jacques A, Besson X, Dayde J, Mailhac N. Histopathological study of response of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon to bark and wood injury with and without inoculation by *Phaeomoniella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea*. 2013; 52(2): 313–323.
143. Andolfi A, Mugnai L, Luque J, Surico G, Cimmino A, Evidente A. Phytotoxins produced by fungi associated with Grapevine Trunk Diseases. *Toxins*. 2011; 3(12): 1569–1605.
144. Marchi G. Susceptibility to Esca of various grapevine (*Vitis vinifera*) cultivars grafted on different rootstocks in a vineyard in the province of Siena (Italy). *Phytopathologia Mediterranea*. 2001; 40(1): 27–36.
145. Santos C, Fragoeiro S, Valentim H, Phillips A. Phenotypic characterisation of *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* strains isolated from grapevines: enzyme production and virulence of extra-cellular filtrate on grapevine calluses. *Scientia Horticulturae*. 2006; 107(2): 123–130.
146. Bruno G, Sparapano L. 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*. 2006; 69(4): 182–194.
147. Fourie PH, Halleen F. Occurrence of grapevine trunk disease pathogens in rootstock mother plants in South Africa. *Australasian Plant Pathology*. 2004; 33(2): 313–315.
148. Eskalen A, Rooney-Latham S, Gubler WD. Occurrence of *Togninia fraxinopennsylvanica* on Esca-diseased grapevines (*Vitis vinifera*) and declining ash trees (*Fraxinus latifolia*) in California. *Plant Disease*. 2005; 89(5): 528.
149. Sanchez-Torres P, Hinarejos R, González V, Tuset JJ. Identification and characterization of fungi associated with Esca in vineyards of the comunidad Valenciana (Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2008; 6(4): 650–660.
150. Jamaux-Despreaux I, Peros JP. Genetic structure in populations of the fungus *Fomitiporia punctata* associated with the Esca syndrome in grapevine. *Vitis*. 2003; 42(1): 43–51.
151. Cortesi P, Fischer M, Milgroom MG. Identification and spread of *Fomitiporia punctata* associated with wood decay of grapevine showing symptoms of Esca. *Phytopathology*. 2000; 90(9): 967–972.
152. van Niekerk JM, Groenewald JZ, Farr DF, Fourie PH, Halleer F, Crous PW. Reassessment of Phomopsis species on grapevines. *Australasian Plant Pathology*. 2005; 34(1): 27–39.

153. Martin MT, Cobos R. Identification of fungi associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*. 2007; 46(1): 18-25.
154. Moller WJ, Kasimatis AN. Further evidence that *Eutypa armeniacae*-not *Phomopsis viticola*-incites dead arm symptoms on grape. *Plant Disease*. 1981; 65(5): 429-431.
155. Peros JP, Berger G, Lahogue F. Variation in pathogenicity and genetic structure in the *Eutypa lata* population of a single vineyard. *Phytopathology*. 1997; 87(8): 799-806.
156. Peros JP, Jamaux-Despreaux I, Berger G, Gerba D. The potential importance of diversity in *Eutypa lata* and co-colonising fungi in explaining variation in development of grapevine dieback. *Mycological Research*. 1999; 103(11): 1385-1390.
157. Cortesi P, Milgroom MG. Outcrossing and diversity of vegetative compatibility types in populations of *Eutypa lata* from grapevines. *Journal of Plant Pathology*. 2001; 83(2): 79-86.
158. Yan JY, Xie Y, Zhang W, Wang Y, Liu JK, Hyde KD, et al. Species of Botryosphaeriaceae involved in grapevine dieback in China. *Fungal Diversity*. 2013; 61(1): 221-236.
159. Larignon P, Fulchic R, Cere L, Dubos B. Observation on black dead arm in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*. 2001; 40: 336-342.
160. Larignon, P. Y a-t-il un lien entre climat et expression du Black Dead Arm? Identification des facteurs climatiques favorisant l'expression des symptômes. *Phytoma La Défense des végétaux*. 2009; (628): 27-29.
161. Destrac-Irvine A, Goutouly JP, Laveau C, Guerin-Dubrana L. L'écophysologie de la vigne-Mieux comprendre les maladies de dépérissement. *L'Union Girondine des Vins de Bordeaux*. 2007; 1035: 28-32.
162. Spagnolo A, Larignon P, Magnin-Robert M, Hovasse A, Cilindre C, van Dorsselaer A, et al. Flowering as the most highly sensitive period of grapevine (*Vitis vinifera* L. cv Mourvèdre) to the Botryosphaeria dieback agents *Neofusicoccum parvum* and *Diplodia seriata* infection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014; 15(6): 9644-9669.
163. Bruno G, Sparapano L. Effects of three Esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: V. Changes in the chemical and biological profile of xylem sap from diseased cv. Sangiovese vines. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2007; 71(4): 210-229.
164. Luini E, Fleurat-Lessard P, Rousseau L, Roblin G, Berjeaud J-M. Inhibitory effects of polypeptides secreted by the grapevine pathogens *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* on plant cell activities. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2010; 74(5): 403-411.
165. Adalat K, Whiting C, Rooney S, Gubler WD. Pathogenicity of three species of *Phaeoacremonium* spp. on grapevine in California. *Phytopathologia Mediterranea*. 2000; 39(1): 92-99.
166. Feliciano AJ, Eskalen A, Gubler WD. Differential susceptibility of three grapevine cultivars to *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora* in California. *Phytopathologia Mediterranea*. 2004; 43(1): 66-69.
167. Gubler WD, Thind TS, Feliciano AJ, Eskalen A. Pathogenicity of *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora* on grape berries in California. *Phytopathologia Mediterranea*. 2004; 43(1): 70-74.
168. Sparapano L, Bruno G, Graniti A. Three-year observation of grapevines cross-inoculated with Esca-associated fungi. *Phytopathologia Mediterranea*. 2001; 40: 376-386.
169. Perrin-Cherieux S, Abou-Mansour E, Tabacchi R. Synthesis and activity of grape wood phytotoxins and related compounds. *Phytopathologia Mediterranea*. 2004; 43(1): 83-86.
170. Strange RN. Phytotoxins produced by microbial plant pathogens. *Natural Product Reports*. 2007; 24(1): 127-144.
171. Reisenzein H, Berger N, Nieder G. Esca in Austria. *Phytopathologia Mediterranea*. 2000; 39(1): 26-34.
172. Bruno G, Sparapano L. Effects of three Esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: I. Characterization of secondary metabolites in culture media and host responses to the pathogens in calli. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2006; 69(4): 209-223.
173. Bruno G, Sparapano L. Effects of three Esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: II. Characterization of biomolecules in xylem sap and leaves of healthy and diseased vines. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2006; 69(4): 195-208.

174. Tabacchi R, Fkyerat A, Poliart C, Dubin GM. Phytotoxins from fungi of Esca of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*. 2000; 39(1): 156–161.
175. Harborne JB. Toxins of plant-fungal interaction. *Handbook of natural toxins: Plant and fungal toxins*. 1983; 1: 743–782.
176. Abou-Mansour E, Couche E, Tabacchi R. Do fungal naphthalenones have a role in the development of Esca symptoms? *Phytopathologia Mediterranea*. 2004; 43(1): 75-82.
177. Mutawila C, Stander C, Halleen F, Vivier MA, Mostert L. Response of *Vitis vinifera* cell cultures to *Eutypa lata* and *Trichoderma atroviride* culture filtrates: expression of defence-related genes and phenotypes. *Protoplasma*. 2017; 254(2): 863–879.
178. Bellee A, Comont G, Nivault A, Abou- Mansour E, Coppin C, Dufour MC, *et al.* Life traits of four Botryosphaeriaceae species and molecular responses of different grapevine cultivars or hybrids. *Plant Pathology*. 2017; 66(5): 763-776.
179. Burki N, Michel A, Tabacchi R. Naphthalenones and isocoumarins of the fungus *Ceratocystis fimbriata* f. sp. platani. *Phytopathologia Mediterranea*. 2003; 42(2): 191–198.
180. Lattanzio V, Lattanzio VM, Cardinali A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research*. 2006; 66(1)(2): 23-67.
181. Evidente A, Punzo B, Andolfi A, Cimmino A, Melck D, Luque J. Lipophilic phytotoxins produced by *Neofusicoccum parvum*, a grapevine canker agent. *Phytopathologia Mediterranea*. 2010; 49(1): 74-79.
182. Klosterman SJ, Subbarao KV, Kang S, Veronese P, Gold SE, Thomma BP, *et al.* Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens. *Plos Pathogens*. 2011; 7(7): e1002137.
183. Lardner R, Mahoney N, Zanker TP, Molyneux RJ, Scott ES. Secondary metabolite production by the fungal pathogen *Eutypa lata*: analysis of extracts from grapevine cultures and detection of those metabolites in planta. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2006; 12(2): 107-114.
184. Schmidt CS, Wolf GA, Lorenz D. Production of extracellular hydrolytic enzymes by the grapevine dieback fungus *Eutypa lata*. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 1999; 106(1): 1–11.
185. Rolshausen PE, Greve LC, Labavitch JM, Mahoney NE, Molyneux RJ, Gubler WD. Pathogenesis of *Eutypa lata* in grapevine: identification of virulence factors and biochemical characterization of cordon dieback. *Phytopathology*. 2008; 98(2): 222–229.
186. Del Rio JA, Gomez P, Baidez A, Fuster MD, Ortuno A, Frias V. Phenolic compounds have a role in the defence mechanism protecting grapevine against the fungi involved in Petri disease. *Phytopathologia Mediterranea*. 2004; 43(1): 87–94.
187. Bell CR, Dickie GA, Harvey WLG, Chan JWYF. Endophytic bacteria in grapevine. *Canadian Journal of Microbiology*. 1995; 41(1): 46–53.
188. Compant S, Mitter B, Colli-Mull JG, Gangl H, Sessitsch A. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microbial Ecology*. 2011; 62(1): 188-197.
189. Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, Pirttila AM, Compant S, Campisano A, *et al.* The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 2015; 79(3): 293–320.
190. Martins G, Lauga B, Miot-Sertier C, Mercier A, Lonvaud A, Soulas ML, *et al.* Characterization of epiphytic bacterial communities from grapes, leaves, bark and soil of grapevine plants grown, and their relations. *Plos One*. 2013; 8(8): e73013.
191. Frey- Klett P, Garbaye JA, Tarkka M. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*. 2007; 176(1): 22-36.
192. Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C, Barka EA. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005; 71(9): 4951-4959.
193. Long HH, Schmidt DD, Baldwin IT. Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result in common growth responses. *Plos One*. 2008; 3(7): e2702.
194. Haidar R, Roudet J, Bonnard O, Dufour MC, Corio-Costet MF, Fert M, *et al.* Screening and

- modes of action of antagonistic bacteria to control the fungal pathogen *Phaeoconiella chlamydospora* involved in grapevine trunk diseases. *Microbiological Research*. 2016; 192: 172–184.
195. Alfonzo A, Conigliaro G, Torta L, Burrzano S, Moschetti G. Antagonism of *Bacillus subtilis* strain AG1 against vine wood fungal pathogens. *Phytopathologia Mediterranea*. 2009; 48(1): 155–158.
196. Lecomte P, Darrieutort G, Liminana J, Louvet G, Tandonnet J, Guerin-Dubrana L, *et al.* Esca de la vigne. II. Vers une gestion raisonnée des maladies de dépérissement. *Phytoma La Défense des Végétaux*. 2008; (616): 37–41.
197. Santos C, Fragoeiro S, Phillips A. Physiological response of grapevine cultivars and a rootstock to infection with *Phaeoacremonium* and *Phaeoconiella* isolates: an *in vitro* approach using plants and calluses. *Scientia Horticulturae*. 2005; 103(2): 187–198.
198. Travadon R, Rolshausen PE, Gubler WD, Cadle-Davidson L, Baumgartner K. Susceptibility of cultivated and wild *Vitis* spp. to wood infection by fungal trunk pathogens. *Plant Disease*. 2013; 97(12): 1529–1536.
199. Guan X, Essakhi S, Laloue H, Nick P, Bertsch C, Chong J. Mining new resources for grape resistance against Botryosphaeriaceae: a focus on *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*. *Plant Pathology*. 2016; 2(65): 273–284.
200. Guerin-Dubrana L, Destrac-Irvine A, Goutouly JP, Letouze A, Gaudillere JP. Relationship between incidence of Esca and black dead arm foliar symptom expression in the vineyard, ecophysiological indicators and cultural practices. *Phytopathologia Mediterranea*. 2005; 44: 110.
201. Corti G, Agnelli A, Coniglio R, Ricci F, Panichi M. Suolo e mal dell'Esca della vite: il punto dall'inizio delle indagini. *Informatore Agrario*. 2004; 60(12): 79–84.
202. Calzarano F, Amalfitano C, Seghetti L, Cozzolino V. Nutritional status of vines affected with Esca proper. *Phytopathologia Mediterranea*. 2009; 48(1): 20–31.
203. Zufferey V. Alimentation en eau et irrigation de la vigne. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture*. 2007; 39(1): 77–78.
204. Crespy A, Pott A. Fonctionnement des terroirs et savoir-faire viticole: les clés de la qualité. *Oenoplurimédia*. 2003.
205. Desprez-Loustau ML, Marçais B, Nageleisen LM, Piou D, Vannini A. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Annals of Forest Science*. 2006; 63(6): 597–612.
206. Urbez-Torres JR, Gubler WD. Susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*. *Plant Pathology*. 2001; 60(2): 261–270.
207. Petit E, Gubler WD. Influence of *glomus intraradices* on Black Foot disease caused by *cylindrocarpon macrodidymum* on *Vitis rupestris* under controlled conditions. *Plant Disease*. 2006; 90(12): 1481–1484.
208. Magnin-Robert M, Letousey P, Spagnolo A, Rabenoelina F, Jacquens L, Mercier L, Clement C, Fontaine F. Leaf stripe form of Esca induces alteration of photosynthesis and defence reactions in presymptomatic leaves. *Functional Plant Biology*. 2011; 38(11): 856–866.
209. Putz FE, Mooney HA. The Biology of Vines. *Cambridge University Press*. 1991.
210. Isnard S, Silk WK. Moving with climbing plants from Charles Darwin's time into the 21st century. *American Journal of Botany*. 2009; 96(7): 1205–1221.
211. Tippet JT, Shigo AL. Barrier zone formation: a mechanism of tree defense against vascular pathogens. *IAWA Journal*. 1981; 2(4): 163–168.
212. Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE, Bouharmont J. Biologie végétale, traduction de la 7e édition américaine par J. Bouharmont avec la collaboration de CM Evrard. *Evrard, 1 ère édition, De Boeck Université*. 2003; 1.
213. Shigo AL, Marx HG. Compartmentalization of decay in trees. *Agriculture Information Bulletin*. 1977; 405: 1–73.
214. Boddy L, Rayner ADM. Origins of decay in living deciduous trees: the role of moisture content and a re-appraisal of the expanded concept of tree decay. *New Phytologist*. 1983; 94(4): 623–641.
215. Shain L. Dynamic responses of differentiated sapwood to injury and infection. *Phytopathology*. 1979; 69: 1134–1137.
216. Robinson RM, Morrison DJ, Jensen GD. Necrophylactic periderm formation in the roots of western larch and Douglas-fir trees infected with *Armillaria ostoyae*. II. The response to the

- pathogen. *Forest Pathology*. 2004; 34(2): 119-129.
217. Blanchette RA, Biggs AR. Defense mechanisms of woody plants against fungi. *Springer Science & Business Media*. 1992.
218. Karban R, Baldwin IT. Induced Responses to Herbivory. *University of Chicago Press*. 2007.
219. Wahlstrom KT, Johansson M. Structural responses in bark to mechanical wounding and *Armillaria ostoyae* infection in seedlings of *Pinus sylvestris*. *European Journal of Forest Pathology*. 1992; 22(2): 65-76.
220. Solla A, Tomlinson F, Woodward S. Penetration of *Picea sitchensis* root bark by *Armillaria mellea*, *Armillaria ostoyae* and *Heterobasidion annosum*. *Forest Pathology*. 2002; 32(1): 55–70.
221. Cleary MR, van der Kamp BJ, Morrison DJ. Effects of wounding and fungal infection with *Armillaria ostoyae* in three conifer species. II. Host response to the pathogen. *Forest Pathology*. 2012; 42(2): 109–123.
222. Larignon P. Contribution à l'identification et au mode d'action des champignons associés au syndrome de l'Esca de la vigne (Thèse de doctorat, Bordeaux : Université de Bordeaux II). 1991.
223. Pouzoulet J. Développement d'une méthodologie PCR en temps réel pour la détection et la quantification in planta des principaux champignons pathogènes associés aux maladies du bois de la vigne (Thèse de doctorat, Toulouse : Université de Toulouse). 2012. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2012INPT0058>
224. Pouzoulet J, Pivovarov AL, Santiago LS, Rolshausen PE. Can vessel dimension explain tolerance toward fungal vascular wilt diseases in woody plants? Lessons from Dutch elm disease and Esca disease in grapevine. *Frontiers in Plant Science*. 2014; 5: 253.
225. Carbonneau A, Deloire A, Jaillard B. The grapevine: physiology, terroir, growing. *Dunod*. 2007.
226. van Leeuwen C. Incidences de l'alimentation en eau de la vigne, appréciée par l'état hydrique du feuillage, sur le développement de l'appareil végétatif et la maturation du raisin (*Vitis vinifera* variété Cabernet franc, Saint-Emilion 1990). *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*. 1994; 28 (2): 81-110.
227. Tramontini S, van Leeuwen C, Domec JC, Destrac-Irvine A, Basteau C, Vitali M, *et al*. Impact of soil texture and water availability on the hydraulic control of plant and grape-berry development. *Plant Soil*. 2013; 368(1): 215–230.
228. Fournioux JC, Adrian M. Morphologie et anatomie de la vigne. *Feret*. 2011.
229. Calzarano F, Di Marco S. Wood discoloration and decay in grapevines with esca proper and their relationship with foliar symptoms. *Phytopathologia Mediterranea*. 2007; 46(1): 96-101.
230. Di Marco S, Osti F. Effect of biostimulant sprays on *Phaeoemoniella chlamydospora* and Esca proper infected vines under greenhouse and field conditions. *Phytopathologia Mediterranea*. 2009; 48(1): 47-58.
231. Calzarano F, Di Marco S, Cesari A. Benefit of fungicide treatment after trunk renewal of vines with different types of Esca necrosis. *Phytopathologia Mediterranea*. 2004; 43(1): 116–124.
232. Calzarano F, Cichelli A, Odoardi M. Preliminary evaluation of variations in composition induced by Esca on cv. Trebbiano d'Abruzzo grapes and wines. *Phytopathologia Mediterranea*. 2001; 40: 443–448.
233. Calzarano F, D'Agostino V, Del Carlo M. Trans- resveratrol extraction from grapevine: application to berries and leaves from vines affected by Esca proper. *Analytical Letters*. 2008; 41(4): 649-661.
234. Pasquier G, Lapaillerie D, Vilain S, Dupuy JW, Lomenech AM, Claverol S, *et al*. Impact of foliar symptoms of “Esca proper” on proteins related to defense and oxidative stress of grape skins during ripening. *Proteomics*. 2013; 13(1): 108-118.
235. Fontaine F, Pinto C, Vallet J, Clément C, Gomes AC, Spagnolo A. The effects of grapevine trunk diseases (GTDs) on vine physiology. *European Journal of Plant Pathology*. 2016; 144: 707-721.
236. Felgueiras M, Chicau G, Pereira JM, Dias ACP. Effects of Esca disease on leaf gas exchange of cv. alvarinho in a vineyard of the Portuguese Vinho Verde region. *5th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases : Esca and Grapevine Declines* (Davis : University of California). 2006.
237. Christen DG. Towards an integrative management of eutypa dieback and Esca disease of grapevine (Doctoral dissertation Zurich, Swiss Federal Institute of Technology). 2006.

238. Baker NR, Nogues S, Allen DJ, Lumsden P. Plants and UV-B: responses to environmental change. Photosynthesis and photoinhibition. *Cambridge University Press*. 1997; 64: 95-111.
239. Lima MR, Felgueiras ML, Graça G, Rodrigues JE, Barros A, Gil AM, Dias AC. NMR metabolomics of Esca disease-affected *Vitis vinifera* cv. Alvarinho leaves. *Journal of Experimental Botany*. 2010; 61(14): 4033-4042.
240. Valtaud C, Foyer CH, Fleurat-Lessard P, Bourbouloux A. Systemic effects on leaf glutathione metabolism and defence protein expression caused by Esca infection in grapevines. *Functional Plant Biology*. 2009; 36: 260-279.
241. Valtaud C, Thibault F, Larignon P, Bertsch C, Fleurat-Lessard P, Bourbouloux A. Systemic damage in leaf metabolism caused by Esca infection in grapevines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2011; 17: 101-110.
242. Lambert C, Khiok ILK, Lucas S, Telef-Micouleau N, Merillon JM, Cluzet S. A faster and a stronger defense response: one of the key elements in grapevine explaining its lower level of susceptibility to Esca? *Phytopathology*. 2013; 103(10): 1028-1034.
243. Calzarano F, Marco SD, D'Agostino V, Schiff S, Mugnai L. Grapevine leaf stripe disease symptoms (Esca complex) are reduced by a nutrients and seaweed mixture. *Phytopathologia Mediterranea*. 2014; 53(3): 543-558.
244. Letousey P, Baillieul F, Perrot G, Rabenoelina F, Boulay M, Vaillant-Gaveau N, *et al.* Early events prior to visual symptoms in the apoplectic form of grapevine Esca disease. *Phytopathology*. 2010; 100(5): 424-431.
245. Ouadi L, Bruez E, Bastien S, Vallance J, Lecomte P, Domec JC, *et al.* Ecophysiological impacts of Esca, a devastating grapevine trunk disease, on *Vitis vinifera* L. *Plos One*. 2019; 14(9): e0222586.
246. Surico G, Mugnai L, Marchi G. Older and more recent observations on Esca: a critical overview. *Phytopathologia Mediterranea*. 2006; 45: 68-86.
247. Christen D, Schonmann S, Jermini M, Strasser RJ, Defago G. Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to Esca disease by *in situ* chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. *Environmental and Experimental Botany*. 2007; 60: 504-514.
248. Fleurat-Lessard P, Bourbouloux A, Thibault F, Menard E, Bere E, Valtaud C, *et al.* Differential occurrence of suberized sheaths in canes of grapevines suffering from black dead arm, Esca or Eutypa dieback. *Trees*. 2013; 27(4): 1087-1100.
249. Shigo AL. A codit view of tree cankers. *Phytopathology*. 1982; 72(2).
250. Abou-Mansour E, Debieux JL, Ramirez-Suero M, Benard-Gellon M, Magnin-Robert M, Spagnolo A, *et al.* Phytotoxic metabolites from *Neofusicoccum parvum*, a pathogen of Botryosphaeria dieback of grapevine. *Phytochemistry*. 2015; 115: 207-215.
251. Spagnolo A, Magnin-Robert M, Alayi TD, Cilindre C, Mercier L, Schaeffer-Reiss C, *et al.* Physiological changes in green stems of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay in response to Esca proper and apoplexy revealed by proteomic and transcriptomic analyses. *Journal of Proteome Research*. 2011; 11(1): 461-475.
252. Rojas CM, Senthil-Kumar M, Tzin V, Mysore K. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Frontiers in Plant Science*. 2014; 5: 17.
253. Bolton MD. Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2009; 22(5): 487-497.
254. Berger S, Sinha AK, Roitsch T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany*. 2007; 58(15-16): 4019-4026.
255. Fropa C. The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. *Physiologia Plantarum*. 2003; 119(4): 469-479.
256. Monteiro S, Barakat M, Piçarra-Pereira MA, Teixeira AR, Ferreira RB. Osmotin and Thaumatin from grape: a putative general defense mechanism against pathogenic fungi. *Phytopathology*. 2003; 93(12): 1505-1512.
257. Colditz F, Niehaus K, Krajinski F. Silencing of PR-10-like proteins in *Medicago truncatula* results in an antagonistic induction of other PR proteins and in an increased tolerance upon infection with the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Planta*. 2007; 226(1): 57-71.

258. van Loon LC, Rep M, Pieterse CM. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*. 2006; 44: 135-162.
259. Kortekamp A. Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2006; 44(1): 58–67.
260. Waters ER, Lee GJ, Vierling E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany*. 1996; 47(3): 325-338.
261. Yang L, Lin H, Takahashi Y, Chen F, Walker MA, Civerolo EL, *et al.* Proteomic analysis of grapevine stem in response to *Xylella fastidiosa* inoculation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2011; 75: 90-99.
262. Gurley WB. HSP101: a key component for the acquisition of thermotolerance in plants. *The Plant Cell*. 2000; 12(4).
263. Magnin-Robert M, Spagnolo A, Dilezitoko Alayi T, Cilindre C, Mercier L, Schaeffer-Reiss C, *et al.* Proteomic insights into changes in grapevine wood in response to Esca proper and apoplexy. *Phytopathologia Mediterranea*. 2014; 53(1): 168-187.
264. Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Reddy MS, Wang, L. The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*. 2002; 3(5): 371-390.
265. Tuzun S, Somanchi A. The possible role of PR proteins in multigenic and induced systemic resistance. *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants*. 2006: 112-142.
266. Cruiziat P. Les relations plante-eau, de la cellule à la plante entière. L'eau dans l'espace rural. Production végétale et qualité de l'eau. *INRA-Editions*. 1997: 11-40.
267. Dixon HH, Joly J. On the Ascent of Sap. *Proceedings of the Royal Society of London*. 1894; 57: 3–5.
268. Zufferey V, Murisier F. Comportement de la vigne en fonction des conditions pedo-climatiques. *Rapport Final Terrois VD*. 2004.
269. Laberche JC. Biologie végétale 3e édition. *Dunod*. 2010.
270. Fischer RA, Hsiao TC. Stomatal opening in isolated epidermal strips of *Vicia faba*. II. Responses to KCl concentration and the role of potassium absorption. *Plant Physiology*. 1968; 43(12): 1953–1958.
271. Outlaw WH, Manchester J. Guard cell starch concentration quantitatively related to stomatal aperture. *Plant Physiology*. 1979; 64(1): 79-82.
272. Hopkins WG. Physiologie végétale. *De Boeck Supérieur*. 2003.
273. Lawson T. Guard cell photosynthesis and stomatal function. *New Phytologist*. 2009; 181(1): 13-34.
274. Pandey S, Zhang W, Assmann SM. Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. *FEBS Letters*. 2007; 581(12): 2325–2336.
275. Day ME. Influence of temperature and leaf-to-air vapor pressure deficit on net photosynthesis and stomatal conductance in red spruce (*Picea rubens*). *Tree Physiology*. 2000; 20(1): 57–63.
276. Yong JWH, Wong SC, Farquhar GD. Stomatal responses to changes in vapour pressure difference between leaf and air. *Plant, Cell & Environment*. 1997; 20(10): 1213–1216.
277. Aasamaa K, Sober A. Stomatal sensitivities to changes in leaf water potential, air humidity, CO₂ concentration and light intensity, and the effect of abscisic acid on the sensitivities in six temperate deciduous tree species. *Environmental and Experimental Botany*. 2011; 71(1): 72–78.
278. Jarvis PG. The interpretation of the variations in leaf water potential and stomatal conductance found in canopies in the field. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*. 1976; 273(927): 593-610.
279. Lu Z, Quinones MA, Zeiger E. Temperature dependence of guard cell respiration and stomatal conductance co-segregate in an F₂ population of *Pima cotton*. *Functional Plant Biology*. 2000; 27(5): 457–462.
280. Domec JC, Rivera LN, King JS, Peszlen I, Hain F, Smith B, *et al.* Hemlock woolly adelgid (*Adelges tsugae*) infestation affects water and carbon relations of eastern hemlock (*Tsuga canadensis*) and Carolina hemlock (*Tsuga caroliniana*). *New Phytologist*. 2013; 199(2): 452-463.
281. Edwards J, Salib S, Thomson F, Pascoe IG. The impact of *Phaeomoniella chlamydospora* infection on the grapevine's physiological response to water stress Part 2: Cabernet Sauvignon and Chardonnay. *Phytopathologia Mediterranea*. 2007; 46(1): 38-49.

282. Lafon R. Modifications à apporter à la taille de la vigne des Charentes: taille Guyot-Poussart mixte et double; L'Apoplexie: traitement préventif (méthode Poussard): traitement curatif. *Imprimerie Roumegous et Dehan*. 1921
283. Herlemont B, Larignon P, Guerin L. Etat d'avancement des recherches sur les alternatives à l'arsénite de soude contre les maladies du bois de la vigne. *Le Progrès Agricole et Viticole*. 2005; 122(20): 431-432.
284. Creaser ML, Wicks TJ. Short-term effects of remedial surgery to restore productivity to *Eutypa lata* infected vines. *Phytopathologia Mediterranea*. 2004; 43(1): 105-107.
285. Sosnowski MR, Wicks TJ, Scott ES. Control of *Eutypa* dieback in grapevines using remedial surgery. *Phytopathologia Mediterranea*. 2011; 50(4): 277-284.
286. Mondello V, Larignon P, Armengol J, Kortekamp A, Vaczy K, Prezman F, *et al.* Management of grapevine trunk diseases: knowledge transfer, current strategies and innovative strategies adopted in Europe. *Phytopathologia Mediterranea*. 2018; 57: 369-383.
287. Epstein L, Sukhwinder K, Vandergheynst J. Botryosphaeria-related dieback and control investigated in noncoastal California grapevines. *California Agriculture*. 2008; 62(4): 161-166.
288. Geoffrion R, Renaudin I. Anti-Esca pruning. A useful measure against outbreaks of this old grapevine disease. *Phytoma La Défense des Végétaux*. 2002; (554): 23-27.
289. Dubos B, Blancard D, Boniface JC. L'eutypiose: un dépérissement de la vigne récemment identifié. *Phytoma La Défense des Végétaux*. 1980; (320): 13-15.
290. Le Gall D, Le Gat Y. Evaluation de la nuisibilité de l'eutypiose au vignoble. *Annales ANPP (Association nationale de protection des plantes)*. 1994; 6: 1271-1284.
291. Dumot V, Menard E, Courlit Y, Ouvrie M, Desache F, Boursier N, *et al.* L'eutypiose en Charentes: résultats de dix ans d'étude sur Ugni blanc. *Phytoma La Défense des Végétaux*. 2004; (568): 4-7.
292. Cahurel JY. Influence of training system on wood diseases. *IFV Pôle Beaujolais*, Bourgogne, Jura, Savoie. 2009.
293. Rolshausen PE, Urbez-Torres JR, Rooney-Latham S, Eskalen A, Smith RJ, Gubler WD. Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2010; 61(1): 113-119.
294. van Niekerk JMV, Halleen F, Fourie PH. Temporal susceptibility of grapevine pruning wounds to trunk pathogen infection in South African grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*. 2011; 50(4): 139-150;
295. Serra S, Mannoni MA, Ligios V. Studies on the susceptibility of pruning wounds to infection by fungi involved in grapevine wood diseases in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*. 2008; 47(3): 234-246.
296. Elena G, Luque J. Pruning debris of grapevine as a potential inoculum source of *Diplodia seriata*, causal agent of Botryosphaeria dieback. *European Journal of Plant Pathology*. 2016; 144(4): 803-810.
297. Weber EA, Trouillas FP, Gubler WD. Double pruning of grapevines: a cultural practice to reduce infections by *Eutypa lata*. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2007; 58(1): 61-66.
298. Silvestroni O, Intrieri C. Advances on winter mechanical pruning of grapevine: equipments and training systems. *Compte rendu : Seminaire International sur la Taille Mécanique de la Vigne*. 1983: 49-74.
299. Sanliang G, Robert CC, Guoqiang D, Abdul H, Kenneth CF, John L, *et al.* Effect of training-pruning regimes on *Eutypa* dieback and performance of 'Cabernet Sauvignon' grapevines. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 2005; 80(3): 313-318.
300. Sun Q, Rost TL, Matthews MA. Pruning-induced tylose development in stems of current-year shoots of *Vitis vinifera* (Vitaceae). *American Journal of Botany*. 2006; 93(11): 1567-1576.
301. Mutawila C, Halleen F, Mostert L. Development of benzimidazole resistant *Trichoderma* strains for the integration of chemical and biocontrol methods of grapevine pruning wound protection. *BioControl*. 2015; 60(3): 387-399.
302. Diaz GA, Latorre BA. Efficacy of paste and liquid fungicide formulations to protect pruning wounds against pathogens associated with grapevine trunk diseases in Chile. *Crop Protection*. 2013; 46: 106-112.
303. Bester W, Crous PW, Fourie PH. Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning

- wound protectants against *Botryosphaeria* species. *Australasian Plant Pathology*. 2007; 36(1): 73-77.
304. Sosnowski MR, Creaser ML, Wicks TJ, Lardner R, Scott ES. Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2008; 14(2): 134-142.
305. Gava CAT, Menezes MEL. Eficiência de isolados de *Trichoderma* spp no controle de patógenos de solo em meloeiro amarelo. *Revista Ciência Agronômica*. 2012; 43(4): 633-640.
306. Lee HL, Chang CK, Jeng WY, Wang AHJ, Liang PH. Mutations in the substrate entrance region of β -glucosidase from *Trichoderma reesei* improve enzyme activity and thermostability. *Protein Engineering, Design & Selection*. 2012; 25(11): 733-740.
307. Amreen T, Kumar VBS. *In vitro* evaluation of native *Trichoderma harzianum* against major fungal pathogen of flower and fruit crops. *Environment and Ecology*. 2012; 30(3): 1039-1041.
308. Calderon AA, Zapata JM, Munoz R, Pedreno MA, Barcelo AR. Resveratrol production as a part of the hypersensitive- like response of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride*. *New Phytologist*. 1993; 124(3): 455-463.
309. Halleen F, Fourie PH. Protection of grapevine pruning wounds against fungal infections. *Phytopathologia Mediterranea*. 2005; 44: 117-118.
310. Pertot I, Longa CO, Savazzini F, Michelon L, Prodorutti D, Pellegrini C, et al. *Trichoderma atroviride* SC1 for biocontrol of fungal diseases in plants. *IOBC-WPRS Bulletin*. 2009; 43: 185-188.
311. Halleen F, Fourie PH, Lombard PJ. Protection of grapevine pruning wounds against *Eutypa lata* by biological and chemical methods. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 2010; 31(2): 125-132.
312. Kotze C, van Niekerk J, Mostert L, Halleen F, Fourie P. Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. *Phytopathologia Mediterranea*. 2011; 50: 247-263.
313. Pajot E, Mounier E, Blal B, Cortes F, Coutant A. Selection steps of the *Trichoderma atroviride* strain i-1237, and some practical results of the development of the fungi within the cankers diseases of grapevine and soil borne diseases of vegetables. *IOBC, Reims*. 2012: 24-27.
314. Compant S, Mathieu F. Biocontrol of major grapevine diseases: leading research. *CABI Publishing, Cambridge*. 2016.
315. Mounier E, Cortes F, Cadious M, Pajot E. The benefits of *Trichoderma atroviride* I-1237 for the protection of grapevines against trunk diseases: from the nursery to the vineyard. *Phytopathologia Mediterranea*. 2014; 53: 591-592.
316. Reggiori F, Aloï C, Baleani M, Benanchi M, Bigot G, Bortolotti P, et al. Remedier® (*Trichoderma asperellum* and *Trichoderma gamsii*): a new opportunity to control the Esca disease complex. Four-year results of field trials in Italy. *Atti, Giornate Fitopatologiche, Chianciano Terme (Siena)*. 2014; 2: 363-372.
317. Bigot G, Freccero A, Montermini A, Bortolotti P, Nannini R. Impiego di *Trichoderma* contro il mal dell'Esca della vite. *Informatore Agrario*. 2015; 6: 62-66.
318. Reis P, Magnin-Robert M, Nascimento T, Spagnolo A, Abou-Mansour E, Fioretti C, et al. Reproducing *Botryosphaeria dieback* foliar symptoms in a simple model system. *Plant Disease*. 2016; 100(6): 1071-1079.
319. Nascimento T, Rego C, Oliveira H. Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk diseases. *Phytopathologia Mediterranea*. 2007; 46(2): 218-224.
320. Octave S, Ambrabe BE, Luini E, Ferreira T, Fleurat-Lessard P, Roblin G. Antifungal effects of cysteine towards *Eutypa lata*, a pathogen of vineyards. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2005; 43(10): 1006-1013.
321. Sosnowski MR, Loschiavo AP, Wicks TJ, Scott ES. Evaluating treatments and spray application for the protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata*. *Plant Disease*. 2013; 97(12): 1599-1604.
322. Savocchia S, Ayres M, Billones-Baaijens R, Sosnowski MR. Remedial surgery for the management of *Botryosphaeria dieback* in grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*. 2015; 53: 587-588.
323. Sosnowski M, Ayres M, Scott E. Trunk diseases: the influence of water deficit on grapevine trunk disease. *Wine & Viticulture Journal*. 2016; 31(4): 46.

324. Sosnowski M, Ayres M, McCarthy M, Wicks T, Scott E. Pests and diseases: investigating the potential for resistance to grapevine trunk diseases. *Wine & Viticulture Journal*. 2016; 31(5): 41.
325. Becker A. Alte Reben - neues Leben. *ATW - Ausschuss für Technik im Weinbau, Vorhaben. Der Deutsche Weinbau*. 2018; 4(188): 21-26.
326. Hausteim M, Becker A, Kortekamp A. Einfluss der Rebengattung auf die intraorganismische Ausbreitung stammassoziierter GTD-Pathogene und Bedeutung für die Langlebigkeit. *Julius-Kühn-Archiv*. 2016; 454: 124-125.
327. Cholet et al 2019. www.phytoma-ldv.com [Internet]. [cited 2019 Oct 25]. Available from: http://www.phytoma-ldv.com/article-24553-VIGNE_NOVEMBRE_2019
328. SICAVAC. Le guide pratique de la taille Guyot. Limiter le dépérissement des vignes. *SICAVAC & BIVC. Imprimerie Paquereau*, Angers, France. 2008. ISBN 978-2-914787-35-2.
329. SICAVAC. Manuel des pratiques viticoles contre les maladies du bois. *SICAVAC & BICV. Imprimerie Paquereau*, Angers, France. 2013.
330. Calzarano F, Marco SD. Further evidence that calcium, magnesium and seaweed mixtures reduce grapevine leaf stripe symptoms and increase grape yields. *Phytopathologia Mediterranea*. 2018; 57(3): 459-471.
331. Darrietort G, Lecomte P. Evaluation of a trunk injection technique to control grapevine wood diseases. *Phytopathologia Mediterranea*. 2007; 46(1): 50-57.
332. Dula T, Kappes EM, Horvath A, Rabai A. Preliminary trials on treatment of Esca-infected grapevines with trunk injection of fungicides. *Phytopathologia Mediterranea*. 2007; 46(1): 91-95.
333. Fourie PH, Halleen F. Chemical and biological protection of grapevine propagation material from trunk disease pathogens. *European Journal of Plant Pathology*. 2006; 116(4): 255–265.
334. Jousse C. Contribution à la lutte contre les maladies du bois de la vigne, en particulier l'Esca (Thèse de doctorat, Poitiers: Université de Poitiers). 2006. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00185265/document>
335. Di Marco S, Mazzullo A, Calzarano F, Cesari A. The control of Esca: status and perspectives. *Phytopathologia Mediterranea*. 2000; 39(1): 232–240.
336. Handelsman J, Stabb E. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell*. 1996; 8(10): 1855–1869.
337. Harman GE. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 2006; 96(2): 190-194.
338. Pal KK, Gardener BM. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. 2006: 1-25.
339. Benard-Gellon M, Farine S, Goddard ML, Schmitt M, Stempien E, Pensec F, et al. Toxicity of extracellular proteins from *Diplodia seriata* and *Neofusicoccum parvum* involved in grapevine Botryosphaeria dieback. *Protoplasma*. 2015; 252(2): 679–687.
340. van Woerkom AH, Acimovic SG, Sundin GW, Cregg BM, Mota-Sanchez D, Vandervoort C, et al. Trunk injection: an alternative technique for pesticide delivery in apples. *Crop Protection*. 2014; 65: 173–185.
341. Byrne FJ, Urena AA, Robinson LJ, Krieger RI, Docola J, Morse JG. Evaluation of neonicotinoid, organophosphate and avermectin trunk injections for the management of avocado thrips in California avocado groves. *Pest Management Science*. 2012; 68(5): 811–817.
342. Bourdrez P, Delgado R, Wyss P. Micro-injection sur pin, palmier, chêne et marronnier. *Phytoma La Défense des Végétaux*. 2014; (678): 2-6.
343. Fischer J, Beckers SJ, Yiamsawas D, Thines E, Landfester K, Wurm FR. Targeted drug delivery in plants: enzyme-responsive lignin nanocarriers for the curative treatment of the worldwide Grapevine Trunk Disease Esca. *Advanced Science*. 2019; 6(15): 1802315.
344. Bertsch C, Albrecht S, Tarnus C, Gellon M. Use of bismuth subsalicylate or one of the derivatives thereof as a phytopharmaceutical agent. *U.S. Patent Application*. 2017; 15/522: 788.
345. Gramaja D, Di Marco S. Identifying practices likely to have impacts on grapevine trunk disease infections: a European nursery survey. *Phytopathologia Mediterranea*. 2015; 54(2): 313–324.
346. Halleen F, Fourie PH. An integrated strategy for the proactive management of grapevine trunk disease pathogen infections in grapevine nurseries. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 2016; 37(2): 104–114.

347. Fourie PH, Halleen F. Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material. *Plant Disease*. 2004; 88(11): 1241-1245.
348. Vignes V, Yobregat O, Barthelemy B, Dias F, Coarer M, Girardon K, *et al.* Wood decay diseases: tests of disinfection methods in French nursery. *Phytopathologia Mediterranea*. 2010; 49: 130-131.
349. Di Marco S, Osti F. Applications of Trichoderma to prevent *Phaeoconiella chlamydospora* infections in organic nurseries. *Phytopathologia Mediterranea*. 2007; 46(1): 73–83.
350. Rooney SN, Gubler WD. Effect of hot water treatments on eradication of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium inflatipes* from dormant grapevine wood. *Phytopathologia Mediterranea*. 2001; 40: 467–472.
351. Edwards J, Pascoe IG, Salib S, Laukart N. Hot water treatment of grapevine cuttings reduces incidence of *Phaeoconiella chlamydospora* in young vines. *Phytopathologia Mediterranea*. 2004; 43: 158-159.
352. Elena G, Di Bella V, Armengol J, Luque J. Viability of Botryosphaeriaceae species pathogenic to grapevine after hot water treatment. *Phytopathologia Mediterranea*. 2015; 54(2): 325-334.
353. Maher N, Piot J, Bastien S, Vallance J, Rey P, Guerin-Dubrana L. Wood necrosis in E-sca-affected vines: types, relationships and possible links with foliar symptom expression. *Oeno One*. 2012; 46: 15-27.
354. Granier A. Une nouvelle méthode pour la mesure du flux de sève brute dans le tronc des arbres. *Annales des Sciences forestières*. 1985; 42: 193-200.
355. Escalona J, Flexas J, Medrano H. Drought effects on water flow, photosynthesis and growth of potted grapevines. *Vitis-Geilweilerhof*. 2002; 41(2): 57-62.
356. Sakuratani T. A heat balance method for measuring water flux in the stem of intact plants. *Journal of Agricultural Meteorology*. 1981; 37(1): 9-17.
357. Steinberg SL, van Bavel CHM, McFarland MJ. Improved sap flow gauge for woody and herbaceous plants. *Agronomy Journal*. 1990; 82(4): 851–854.
358. Valancogne C, Nasr Z. Une méthode de mesure du débit de sève brute dans de petits arbres par bilan de chaleur. *Agronomie*. 1989; 9(6): 609–617.
359. Valancogne C, Granier A. Intérêt des méthodes thermiques de mesure du flux de sève pour l'étude du bilan hydrique des savannes. *IAHS-AISH publication*. 1991; (199): 387–400.
360. Dynamax Inc. Dynagage sap flow sensor user manual. *Dynagage* [en ligne]. 2007. Disponible sur : http://dynamax.com/images/uploads/papers/Dynagage_Manual.pdf [Consulté le 10/09/2019].
361. Fassier-Boulanger S. Les mutations de la filière viticole en France. Des vigneronns de plus en plus engagés dans des pratiques durables : l'exemple alsacien. *Revue Géographique de l'Est*. 2014; 54(1-2).
362. Crespy A. Manuel pratique de taille de la vigne. *Oenoplurimedia*. 2006.
363. Moller WJ, Kasimatis AN. Protection of grapevine pruning wounds from *Eutypa dieback*. *Plant Disease*. 1980; 64(3): 278–280.
364. Goulas Y, Cerovic ZG, Cartelat A, Moya I. Dualex: a new instrument for field measurements of epidermal ultraviolet absorbance by chlorophyll fluorescence. *Applied Optics*. 2004; 43: 4488-4496.
365. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. 2016.
366. Berud F, Richy D. Taille rase sur des parcelles en appellations Côtes du Rhône et Côteaux d'Aix-en-Provence. Bilan de 5 années d'étude. *Vignoble et Conduite de la Vigne* [en ligne]. 2005. Disponible sur : <http://www.institut-rhodanien.com/download/1600+&cd=1&hl=fr&ct=clnk&gl=fr> [Consulté le 10/09/2019]
367. Stone BC. Protective coloration of young leaves in certain Malaysian palms. *Biotropica*. 1979; 11(2): 126.
368. Costa-Arbulu C, Gianoli E, Gonzales WL, Niemeyer HM. Feeding by the aphid *Sipha flava* produces a reddish spot on leaves of *Sorghum halepense*: an induced defense. *Journal of Chemical Ecology*. 2001; 27(2): 273-283.
369. Hipskind J, Wood K, Nicholson RL. Localized stimulation of anthocyanin accumulation and delineation of pathogen ingress in maize genetically resistant to *Bipolaris maydisrace* O. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1996; 49(4): 247-256.
370. Ardi R, Kobiler I, Jacoby B, Keen NT, Prusky D. Involvement of epicatechin biosynthesis in

- the activation of the mechanism of resistance of avocado fruits to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1998; 53(5): 269–285.
371. Christie PJ, Alfenito MR, Walbot V. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta*. 1994; 194(4): 541-549.
372. Krol M, Gray GR, Huner NPA, Hurry VM, Oquist G, Malek L. Low-temperature stress and photoperiod affect an increased tolerance to photoinhibition in *Pinus banksiana* seedlings. *Canadian Journal of Botany*. 1995; 73(8): 1119-1127.
373. Close DC, Davies NW, Beadle CL. Temporal variation of tannins (galloylglucoses), flavonols and anthocyanins in leaves of *Eucalyptus nitens* seedlings: implications for light attenuation and antioxidant activities. *Functional Plant Biology*. 2001; 28(4): 269–278.
374. Kasuga J, Hashidoko Y, Nishioka A, Yoshiba M, Arakawa K, Fujikawa S. Deep supercooling xylem parenchyma cells of katsura tree (*Cercidiphyllum japonicum*) contain flavonol glycosides exhibiting high anti-ice nucleation activity. *Plant, Cell & Environment*. 2008; 31(9): 1335–1348.
375. Hofstetter V, Buyck B, Croll D, Viret O, Couloux A, Gindro K. What if Esca disease of grapevine were not a fungal disease? *Fungal Diversity*. 2012; 1(54): 51–67.
376. Marchi G, Peduto F, Mugnai L, Di Marco S, Calzarano F, Surico G. Some observations on the relationship of manifest and hidden Esca to rainfall. *Phytopathologia Mediterranea*. 2006; 45: 117–126.
377. Bortolami G, Gambetta GA, Delzon S, Lamarque LJ, Pouzoulet J, Badel E, *et al.* Exploring the hydraulic failure hypothesis of Esca leaf symptom formation. *Plant Physiology*. 2019; 181(2): 591.
378. Petit AN, Vaillant N, Boulay M, Clement C, Fontaine F. Alteration of photosynthesis in grapevines affected by Esca. *Phytopathology*. 2006; 96: 1060-1066.
379. Andreini L, Caruso G, Bertolla C, Scalabrelli G, Viti R, Gucci R. Gas exchange, stem water potential and xylem flux on some grapevine cultivars affected by Esca disease. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 2009; 30(2): 142–147.
380. Masi M, Cimmino A, Reveglia P, Mugnai L, Surico G, Evidente A. Advances on fungal phytotoxins and their role in Grapevine Trunk Diseases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018; 66(24): 5948-5958.
381. Magnin-Robert M, Spagnolo A, Boulanger A, Joyeux C, Clement C, Abou-Mansour E, *et al.* Changes in plant metabolism and accumulation of fungal metabolites in response to esca proper and apoplexy expression in the whole grapevine. *Phytopathology*. 2016; 106: 541-553.
382. Haffner E, Konietzki S, Diederichsen E. Keeping control: the role of senescence and development in plant pathogenesis and defense. *Plants*. 2015; 4(3): 449–488.
383. Massonnet M, Morales-Cruz A, Minio A, Figueroa-Balderas R, Lawrence DP, Travadon R, *et al.* Whole-genome resequencing and pan-transcriptome reconstruction highlight the impact of genomic structural variation on secondary metabolite gene clusters in the grapevine Esca pathogen *Phaeoacremonium minimum*. *Frontiers in Microbiology*. 2018; 9: 1784.
384. Morales-Cruz A, Allenbeck G, Figueroa-Balderas R, Ashworth VE, Lawrence DP, Travadon R, *et al.* Closed-reference metatranscriptomics enables in planta profiling of putative virulence activities in the grapevine trunk-disease complex. *Molecular Plant Pathology*. 2018; 19(2): 490-503.
385. Evidente A, Sparapano L, Andolfi A, Bruno G. Two naphthalenone pentaketides from liquid cultures of *Phaeoacremonium aleophilum*, a fungus associated with Esca of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*. 2000; 39(1): 162–168.
386. Fontaine F, Gramaje D, Armengol J, Smart R, Nagy ZA., Borgo M, *et al.* Grapevine trunk diseases. A review. *OIV Publications*, Paris. 2016.
387. Cholet C, Martignon T, Giudici M, Simonit M, Geny L. Vigne: pourquoi tailler moins ras aide à freiner l'Esca. *Phytoma La Défense des Végétaux*. 2017; (702): 38–41.

Impacts écophysologiques de l'Esca: résilience des ceps et effet des modes de taille

L'Esca est une maladie du bois de la vigne caractérisée par la formation initiale de nécroses dans le bois puis par l'apparition, parfois irrégulière, de symptômes foliaires d'une année à l'autre. Le point clé pour comprendre pourquoi un tissu de bois sain de ceps matures se nécrose consiste à déterminer les facteurs favorisant l'activité pathogène des champignons, voire d'autres microorganismes tels les bactéries, et leur aptitude à dégrader les tissus du bois. Les pratiques culturales à l'origine de blessures comme la taille, augmenteraient la sensibilité des vignes aux infections par les principaux agents pathogènes associés à ce dépérissement. Dans ce contexte, une première approche a consisté à étudier l'expression de l'Esca au cours du temps (3 années) en mesurant son impact sur la physiologie des ceps. La discrimination entre ceps sains et symptomatiques, basée sur le suivi d'indicateurs foliaires (e.g. activité photosynthétique, conductance stomatique ou de composés phénoliques), n'est pas pertinente pour une détection précoce. Des différences significatives ne sont observées qu'au moment, ou à la suite, de l'expression des premiers symptômes. Par contre, la mesure des flux de sève s'est avérée efficace dans la détection des ceps symptomatiques, plusieurs semaines avant l'apparition des symptômes foliaires. Son suivi pourrait donc devenir un outil intéressant dans le cadre d'une détection précoce de l'Esca. Une seconde approche consistait à comparer deux modes de taille des ceps. Après 3 ans de suivis, les paramètres physiologiques étudiés sont homogènes pour tous les ceps. Par contre, une différenciation semble s'établir au niveau des cônes de dessiccation, ce qui induirait une dangerosité pour les flux de sève plus conséquente pour la modalité taille dite « conventionnelle » par rapport à celle censée respecter les vaisseaux *in planta*. Au final, on peut émettre l'hypothèse que l'interaction, ainsi que le lien, entre les symptômes internes (i.e. nécroses dans le bois) et externes (i.e. au niveau des feuilles) se ferait au niveau des flux de sève qui constitueraient donc un site d'étude privilégié pour cette maladie.

Mots clés : Esca, Maladies du bois de la vigne, Physiologie, Pratiques culturales

Ecophysiological impacts of Esca: grapevines resilience and influence of pruning systems

Esca is a grapevine trunk disease that is characterized by the formation of necrosis in the inner wood and the erratic expression of foliar symptoms from one year to another. The key to understand why healthy wood tissues become necrotic in mature grapevines lies in the identification of the factors that influence the pathogenic behaviour of Esca-related fungi, or other microorganisms such as bacteria, and their ability to degrade woody tissue. Current viticultural management practices, such as vine pruning, generate open wounds, which increase the risk for grapevines to get infected with Esca-related pathogens. In this context, a first approach consisted in monitoring the expression of Esca over several growing seasons (3 years) by measuring its impact on grapevine physiology. Discrimination between healthy and symptomatic plants based on the surveillance of foliar indicators (e.g., photosynthetic activity, stomatal conductance, phenolic composition) was not efficient for early detection of the disease. Significant differences were observed only at the same time, or just following the expression of the first foliar Esca symptoms. On the contrary, sap flow measurements were effective in the detection of symptomatic vines several weeks before the appearance of any foliar symptoms. This monitoring method could therefore become an interesting tool for the early detection of Esca. A second approach consisted in comparing two types of pruning practices. After 3 years of monitoring, all studied physiological parameters appeared to be homogeneous for all grapevines. Nonetheless, early differences were recorded in the desiccation cones, which would suggest that the "conventional" pruning method probably limited sap flow movement, unlike a pruning system that takes into account the natural stem vessel connectivities. Finally, we can hypothesize that the interactions linking internal symptoms (i.e. necrosis in the wood) and external ones (i.e. foliar symptoms) would be located within sap conducting system, suggesting that xylem vessels are a privileged site to study Esca disease.

Keywords: Cultural practices, Esca, Grapevine Trunk Diseases, Physiology

UMR 1065 SAVE (Santé et Agroécologie du Vignoble)
[INRA - Centre de Recherches de Bordeaux Nouvelle Aquitaine.
71 avenue Edouard Bourlaux. CS 20032, 33882 Villenave-d'Ornon cedex, France]