



HAL
open science

Des forêts aux vignobles : adaptation des champignons dégradeurs de bois

Marion Schilling

► **To cite this version:**

Marion Schilling. Des forêts aux vignobles : adaptation des champignons dégradeurs de bois. Sciences agricoles. Université de Lorraine, 2022. Français. NNT : 2022LORR0300 . tel-04236219

HAL Id: tel-04236219

<https://theses.hal.science/tel-04236219>

Submitted on 10 Oct 2023

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.



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES
UNIVERSITAIRES**

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



SReNa

INRAE

IAM

LVBE

UNIVERSITÉ
HAUTE-ALSACE

INTERACTIONS
ARBRES-MICROORGANISMES

Laboratoire Vigne Biotechnologies
et Environnement, U P R – 3 9 9 1

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

**Mention : Biologie et écologie des forêts et agrosystèmes.
Biologie des populations et écologie**

par Marion SCHILLING

Sous la direction de Dr. Éric GELHAYE et Dr. Sibylle FARINE

**Des forêts aux vignobles : adaptation des champignons
dégradeurs de bois**

16 décembre 2022

Membres du jury :

Rapporteurs :	Mme Chloé DELMAS	CR, INRAE, Bordeaux
	Mme Marielle ADRIAN	Pr., Université de Bourgogne, Dijon
Examineurs :	M. David TOUBOUL	DR, CNRS, Gif-sur-Yvette
	Mme Mélanie MOREL-ROUHIER	Pr., Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy

Président du jury : Mme Mélanie MOREL-ROUHIER

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui ont accepté de lire et d'évaluer mon travail, Dr. Chloé Delmas, Pr. Marielle Adrian, Dr. David Touboul et Pr. Mélanie Morel-Rouhier.

Je souhaite également remercier très sincèrement mon directeur de thèse, Dr. Eric Gelhaye, de m'avoir proposé ce sujet de thèse et de m'avoir fait confiance tout au long de ces trois années. Merci d'avoir su me guider avec un équilibre épatant entre précieux conseils et autonomie. Un grand merci également à ma co-encadrante de thèse Dr. Sibylle Farine, pour sa présence et ses conseils judicieux. J'ai eu la chance d'être accompagnée par deux encadrants aux compétences complémentaires, et à l'optimisme communicatif !

Je souhaite ensuite adresser mes remerciements à Dr. Sébastien Duplessis, directeur de l'UMR Interactions Arbres-Micro-organismes (IAM), et Pr. Mélanie Morel-Rouhier, directrice de l'équipe Réponse aux stress et régulation redox, pour leur accueil et leur soutien tout au long de ces trois années.

Je tiens également à remercier Pr. Christophe Bertsch, directeur du Laboratoire Vigne, Biotechnologies et Environnement (LVB) à Colmar, de m'avoir accueillie dans leur équipe. Merci à tous les membres du laboratoire de m'avoir intégrée et pour les bons moments partagés, en particulier lors de déplacements en commun, à Reims et à Mikulou. Merci Andrea pour ton aide, entre autres lors de la première découpe de ceps, merci Samuele, pour tous les précieux échanges autour de Fomiti.

Un grand merci également à toutes les équipes avec qui j'ai eu la chance de collaborer. Merci à Dr. Philippe Hugueney de m'avoir accueillie au sein de l'équipe Métabolisme et Santé de la Vigne (MSV) à l'INRAE de Colmar. Merci à Dr. Alessandra Maia-Grandard, Dr. Raymonde Baltenweck, et à toute l'équipe MSV pour leur accueil, leurs conseils et leur patience.

Merci à Dr. David Touboul de m'avoir accueillie au sein de l'équipe de spectrométrie de masse à l'ICM de Gif-sur-Yvette, et pour ses précieux conseils. Merci à toute l'équipe pour leur accueil et leur bonne humeur, et surtout un énorme merci à Marceau, pour tout le temps consacré, toujours dans la bonne humeur, tant pour le traitement des échantillons que pour partager ses connaissances dans l'analyse des données.

Merci à Pr. Philippe Gérardin, directeur du Laboratoire d'Etudes et de Recherche sur le Matériau Bois (LERMAB), de m'avoir accueillie, et un grand merci à Pr. Stéphane Dumarçay, pour le temps passé à m'expliquer les rouages et astuces des LC et GC-MS, et pour la confiance et la liberté offertes. Encore une fois merci également à mon directeur de thèse Eric pour avoir su orchestrer et permettre ces riches collaborations.

Merci à Dr. Claire-Veneault-Fourrey pour son regard critique lors de mes comités de suivi individuel, et à Jean-Pierre Péros pour sa contribution à ma première revue et chapitre d'ouvrage.

Merci également à Dr. Justine Bertrand-Michel, que j'ai rencontrée grâce au Réseau Francophone de Métabolomique et Fluxomique (RFMF) et au programme de mentorat lancé par Dr. Audrey Le Gouvellec. Merci de m'avoir accompagnée et conseillée lors de la dernière année, pour ton enthousiasme et pour nos discussions enrichissantes !

Merci à tous les membres du laboratoire IAM pour leur bonne humeur au quotidien et leur dynamisme entraînant ! Merci en particulier à l'ensemble des doctorants, spécialement ceux du grand cru 2019-2023 : Delphine, Damien, Kevin (merci pour les réveils-matinaux-piscine salvateurs !), Loïc, pour les moments de détente et votre bonne humeur. Merci Alicia (thanks for the - even few - climbing sessions), Julie, Laura (merci

pour les presque derniers millilitres d'acétate d'éthyle :)), Natacha pour votre gentillesse. Merci Flavien, d'avoir su faire vivre le 6^{ème}, y avoir amené un peu de nos belles Vosges, (et y avoir même recruté Maida). Grâce à toi je sais que la vie ce n'est pas que les Roigabrageldi, mais aussi les tofaiilles (et surtout le munster). Merci surtout pour ton aide, pour m'avoir dévoilé une partie des secrets des GSTs, et bien sûr pour avoir amené au laboratoire la technologie dernier cri qu'il nous fallait pour l'ouverture des boîtes de culture ! Merci à Nicolas V., pour avoir partagé son expérience et sans qui le démarrage et le déroulé d'une bonne partie de mes expériences auraient sans aucun doute été bien plus compliqués. Merci à Muriel, pour les nombreuses expériences réalisées avec soin et qui m'ont souvent fait gagner un temps précieux. Un grand merci à Delphine, Muriel, Nicolas et Emilie (Rezer) pour les relais en « salle respi » !! Bien sûr un grand merci à Emilie (Robert), bravo pour ta persévérance qui m'a été d'une grande aide ! Merci à Tiphaine pour les conseils et les sauvetages sur l'APLC, à Marie-Laure, Raphaël, pour leur aide indispensable et leur réactivité au quotidien. Merci Corinne pour ta gentillesse et ton aide précieuse à tellement de reprises ! Merci Jean-Pierre, pour ta bonne humeur et tes précieux conseils, entre autres sur les circuits UJT des alentours aux sommets voisins. Merci Jean-Michel pour tes blagues de haut-niveau, j'ai encore besoin (de beaucoup) d'entraînement pour oser rivaliser ! Merci à tous les enseignants-chercheurs de l'équipe pour leur bonne humeur et leurs conseils. Merci Linda pour ta gentillesse, ton dynamisme et ta bonne humeur à toutes épreuves ! Même l'épreuve du tandem (haut-de-gamme) était de la rigolade pour Kevin et toi ! Linda et Tiphaine, je serai toujours supportrice du VMB grâce à vous !

Merci à Renan Brunet et à Jean Mourot, dont le sérieux et l'investissement lors de leurs stages respectifs de M1 et de L3 ont été indispensables à une partie des expérimentations réalisées. J'ai eu beaucoup de chance de vous avoir comme stagiaires.

Un immense merci à Francis Groff, et au domaine familial Valentin Juslin à Orschwihr, pour m'avoir gracieusement permis de collecter sur leurs parcelles le bois de vigne utilisé lors de mes expériences. Merci Francis, pour le temps passé à m'aider à sélectionner et récolter le matériel dans le vignoble, et pour toutes les explications et réponses à mes questions. J'espère que ce travail contribuera autant que possible à mieux comprendre l'Esca !

Je souhaite également remercier ma famille, grâce à qui j'ai pu réaliser cette thèse dans les meilleures conditions. Merci à mes parents d'avoir toujours su me donner le goût d'apprendre, me rendre curieuse et m'encourager à persévérer. À Papy, de toujours savoir nous donner le sourire, Jérémy, pour le soutien moral parfois sans t'en rendre compte, Pauline et Jadou pour votre rayon de soleil, Fanny le « ny » d'être là. Merci à toute la famille Toscano-Lenti pour votre soutien.

Merci Marie, super-colloc et pepette d'amour, d'être toujours là aussi simplement et sincèrement, merci Marlène, Estelle, Annou pour votre présence inconditionnelle même à distance.

Merci enfin à la plus belle rencontre faite au cours de cette thèse... Merci Jonathan pour ta présence et toutes tes petites et grandes attentions, merci pour ton soutien quotidien, aussi bien logistique que moral et parfois sûrement difficile à tenir, merci de m'y faire croire, à la magie des rencontres.

Des forêts aux vignobles : adaptation des champignons dégradeurs de bois

Table des matières

Table des figures	4
Liste des tableaux	6
Abréviations	7
Introduction générale.....	8
1. Dégradation du bois et maladies du bois de vigne (Publication n°1).....	10
2. Les extractibles du bois : diversité, rôle et mécanismes de détoxification	44
2.1. Définition des extractibles	44
2.2. Principaux extractibles du bois de vigne : les stilbénoides.....	45
2.2.1. Les stilbénoides : définition et voie de biosynthèse	45
2.2.2. Répartition des stilbénoides.....	48
2.2.3. Modifications de la composition en stilbénoides du bois.....	50
2.2.4. Propriétés biologiques et rôles des stilbénoides (activités antimicrobiennes et antioxydantes)	52
2.2.5. Activité microbienne : détoxification des stilbénoides	58
2.3. Autres extractibles impliqués dans la durabilité des bois de forêt et de vigne	60
2.3.1. Les extractibles polyphénoliques (hors stilbénoides).....	60
2.3.2. Les polycétides	65
2.3.3. Les acides gras.....	66
2.3.4. Facteurs influençant la composition en extractibles dans le bois.....	66
2.3.5. Propriétés antifongiques et antioxydantes des extractibles (hors stilbénoides)	67
3. Présentation de <i>Fomitiporia mediterranea</i> et <i>Trametes versicolor</i> , deux espèces de pourritures blanches	69
3.1. Principales caractéristiques de <i>F. mediterranea</i>	69

Table des matières

3.1.1. Caractéristiques morphologiques	69
3.1.2. Classification	71
3.2. Principales caractéristiques de <i>T. versicolor</i>	74
4. Objectifs de la thèse	75
Chapitre 1 : Mécanismes de dégradation du bois par <i>F. mediterranea</i> sur différentes essences de sciures de bois.....	
1. Etude de la dégradation du bois de vigne, hêtre et épicéa en sciures par <i>F. mediterranea</i> : approches physiologique, métabolomique et protéomique (Publication n°2).....	77
2. Etude de différentes souches de <i>F. mediterranea</i> et <i>T. versicolor</i> et estimation de la biomasse fongique.....	99
2.1. Introduction.....	99
2.2. Matériels et méthodes	101
2.3. Résultats.....	104
2.4. Discussion et conclusion.....	113
3. Conclusion du chapitre 1	116
Chapitre 2 : Mécanismes de dégradation du bois par <i>F. mediterranea</i> sur différentes essences de bûchettes de bois.....	
1. Etude de la dégradation du bois de vigne, hêtre et chêne en bûchettes par <i>F. mediterranea</i> grâce aux réseaux moléculaires (Publication n°3).....	119
2. Etude de la dégradation du bois de vigne, hêtre et chêne en bûchettes par <i>F. mediterranea</i> : analyses complémentaires (exsudats).....	153
Discussion générale.....	
1. Importance des facteurs biotiques pour l'adaptation de <i>F. mediterranea</i>	160
1.1. Réponse du bois de vigne : effet antifongique et détoxification des extractibles de bois de vigne.....	160
1.2. Influence des communautés microbiennes sur la présence et le comportement de <i>F. mediterranea</i>	164
2. Importance des facteurs abiotiques pour l'adaptation de <i>F. mediterranea</i>	171

Table des matières

2.1. Importance des teneurs en éléments nutritifs.....	171
2.1.1. Effet de la teneur en azote	172
2.1.2. Rôle du fer	175
2.2. Effet de la température.....	176
2.3. Effet du pH.....	179
2.4. Effet du taux d'humidité	180
2.5. Effet de l'oxygène.....	181
3. Des traits caractéristiques de <i>F. mediterranea</i> peuvent-ils contribuer à son adaptation au bois de vigne ?.....	185
3.1. Traits morphologiques	185
3.2. Autres traits caractéristiques	188
Conclusion générale	194
Références	196
Annexes.....	214
1. Annexe 1 : principaux stilbénoides identifiés dans les parties lignifiées de la vigne.	215
2. Annexe 2 : principaux extractibles identifiés dans les bois de forêt et principaux extractibles (hors stilbénoides) identifiés dans les parties lignifiées de la vigne.	218
3. Annexe 3 : Revue détaillée sur le principal agent fongique associé à l'Esca en Europe : <i>Fomitiporia mediterranea</i> M. Fisch. (Publication n°4)	221
4. Annexe 4 : nombre de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation ou la détoxification du bois identifiés dans les génomes de Fmed et de Tver.....	251
5. Annexe 5 : réseau moléculaire obtenu à partir des exsudats des cultures de <i>F. mediterranea</i> et <i>T. versicolor</i> en présence de bûchettes	253

Table des figures

Figure 1: photographies de symptômes typiques de l'Esca : (a) "feuilles tigrées", (b) nécroses brunes dans le bois et (c) nécroses brunes accompagnées de pourriture blanche (amadou).	9
Figure 2 : voies du shikimate et des phénylpropanoïdes : voie de biosynthèse générale des polyphénols (Vogt, 2010).	46
Figure 3: voie de biosynthèse des stilbénoides dans les plantes (adapté de Valletta et al., 2021).	47
Figure 4: structure chimique de stilbènes monomériques oxydés : (a) dihydroresvératrol, (b) dihydropinosylvine, (c) dihydrophénanthrene.	48
Figure 5: structure chimique de stilbènes présents dans le bois d'arbres forestiers : (a) éther monométhyle de pinosylvine, (b) pinostilbène, (c) picéatannol, (d) astringine. (e) isorhapontine et (f) isorhapontigénine.	49
Figure 6: structure chimique d'oligomères de stilbènes : (a) epsilon-viniferine, (b) pallidol, (c) trans-delta-viniférine, (d) alpha-viniférine, (e) hopéaphénol. (f) vitisin C, (g) ampélospine A.	51
Figure 7: structure chimique des stilbénoides inhibant la croissance de Fmed (Lambert et al., 2012) : (a) vitisine A, (b) vitisine B, (c) trans-ptérostilbène, (d) miyabenol C et (e) isohopéaphénol.	55
Figure 8: dégradation enzymatique par oxydation et polymérisation du resvératrol par des micro-organismes (adapté de Mei et al., 2015).	59
Figure 9: squelette de base des flavonoïdes et des principales classes de flavonoïdes (Liu et al., 2021).	62
Figure 10: structure chimique (a) de la catéchine, une proanthocyanidine et unité de base de tanins condensés, (b) de l'acide digallique, formant des gallotanins, et de (c) l'acide ellagique et (d) l'acide hexahydroxyphénique, formant des ellagitanins.	63
Figure 11: structure chimique des lignanes identifiées dans le bois de <i>Abies alba</i> : (a) sécoisolaricirésinol, (b) isolaricirésinol, (c) matairésinol, (d) pinorésinol, (e) laricirésinol (Vek et al., 2021).	64
Figure 12: structure chimique des coumarines (a) 2H-1-benzopyrane-2-one (squelette de base des coumarines) et (b) scopolétine.	64
Figure 13: structure chimique de terpénoïdes de bois : (a) l'isoprène, (b) le trans-allo-ocimène, (c) la γ -decalactone, (d) le β -élémente, (e) le calarène, (f) l'acide abiétique et (g) le β -sitostérol.	66
Figure 14: structure de 3 acides gras identifiés dans des extraits de pin et d'épicéa : acides (a) linoléique, (b) oléique et (c) pinoléique.	66
Figure 15 : (a) hyphes végétatifs squelettiques de Fmed prélevés d'un tronc de vigne affecté par l'Esca et observés au cryo-microscope électronique à balayage (Cryo-SEM) x 2000 (Moretti et al., 2021) et (b) carpophore de Fmed à proximité des plaies de taille d'un cep de vigne (en hiver en Europe centrale, © M. Fischer) (Fischer and Garcia, 2015).	70
Figure 16 : morphologie (type B) de Fmed (souche phco36) sur malt-agar (2-3%) après 14 jours à 30°C.	71
Figure 17: (a) schéma du système hyphal trimitique de Tver (1) hyphes génératifs hyalins à paroi très fine, à septations noueuses et avec des anses d'anastomose (ou boucles) simples ; (2) hyphes squelettiques, plus larges et à paroi épaisse et (3) hyphes ligatives plus minces et sinueuses (Teixeira, 1960) ; et (b) morphologie du carpophore (ou polypore) de Tver sur bois mort en forêt.	74
Figure 18: cultures sur sciure de vigne, hêtre et épicéa après 1(1-m.), 2 (2-m.) et 3 mois (3-m.) à 27°C	105

Table des matières

Figure 19: taux de minéralisation du carbone par jour de culture au cours des 3 mois de culture et taux de minéralisation maximaux des cultures de (a) Fmed LR124 et (b) Tver BRFM1532 sur sciure de vigne cv. 'Gewurztraminer', hêtre et épicea.	106
Figure 20: pertes de masses des cultures de Fmed LR124 et phco36 et de Tver BRFM1218 et BRFM1532 sur sciure de vigne après 1, 2 et 3 mois de culture.	107
Figure 21: composition en fibres du bois des cultures de Fmed LR124 et Tver BRFM1532 après 1, 2 et 3 mois de culture.	108
Figure 22: répartition des constituants des mycéliums de Fmed phco36 et Tver BRFM1532 selon le protocole d'estimation des teneurs en fibres du bois.	109
Figure 23: différences significatives en Log2 entre les abondances de métabolites cibles dans les cultures de Fmed phco36 et LR124 et de Tver BRFM1218 et BRFM1532 par rapport aux contrôles respectifs à 0, 1, 2 et 3 mois de culture.	110
Figure 24: abondances relatives des principales familles de protéines des sécrétomes de Fmed LR124 et Tver BRFM1532 sur sciure de bois de vigne à 1 et 3 mois de culture (moyenne).	110
Figure 25: teneurs en ergostérol des cultures (a) de Fmed phco36 et LR124 et de Tver BRFM1218 et BRFM1532 sur vigne, et (b) de Fmed phco36 et Tver BRFM1218 sur hêtre à 1, 2 et 3 mois de culture, obtenues par dosage HPLC-DAD-UV.	111
Figure 26: biomasses fongiques estimées d'après leurs teneurs en ergostérol des cultures (a) de Fmed phco36 et LR124 et de Tver BRFM1218 et BRFM1532 sur vigne, et (b) de Fmed phco36 et Tver BRFM1218 sur hêtre à 1, 2 et 3 mois de culture.	112
Figure 27: photographies d'exsudats observés à la surface du mycélium de (a-b) Fmed LR124 et (c-e) Fmed phco36 en présence de bûchettes de chêne (a), vigne (b-d) et hêtre (e) après 7 mois de culture à 27°C.	154
Figure 28: photographie d'exsudats observés à la surface du mycélium de Tver BRFM1218 en présence de bûchettes de vigne après 7 mois de culture à 27°C.	154
Figure 29: dispositif expérimental mis en place pour observer les effets des extractibles du bois de vigne à distance du mycélium de Fmed et Tver.	162
Figure 30: morphologies et distances du centre de l'inoculum à l'extrémité du mycélium (avec courbes de régression linéaire pour chaque condition) des cultures de Fmed LR124, phco36 et Tver BRFM1532 en présence d'extractibles de bois de vigne cv. 'Gewurztraminer' (Gew), 'Riesling' (Ries) ou 'Pinot noir' (PN) à 10mg/mL ou en l'absence d'extractibles (ctrl) après 10 à 17 jours de culture à 27°C.	162
Figure 31: chromatogramme d'un extrait de bois de vigne cv. 'Gewurztraminer' témoin obtenu en UHPLC-ESI-MS en mode négatif.	163
Figure 32: co-cultures de (a-c) Fmed (gauche) face à (a) Gloeophyllum trabeum, (b) Pleurotus ostreatus ou (c) Tver et de (d) Tver (gauche) face à G. trabeum après 14 jours de culture à 27°C sur malt-agar.	166
Figure 33: co-cultures de Fmed phco36 (à gauche) et d'endophytes non-identifiés (à droite) issus de bois morts de vigne de différents cépages (Gewurztraminer, Pinot noir, Riesling), d'apparence saine ou nécrosée, après 15 jours à 27 degrés sur malt-agar.	166

Table des matières

Figure 34: (a) morphologie après 14 jours et (b) suivi de la croissance du mycélium de <i>Fmed</i> en cours de culture à 27°C sur P25 modifié à différentes concentrations en azote: C0 (0M), C1 (0,11 mM, C/N 2859), C2 (0,20 mM, C/N 1649), C3 (0,41 mM, C/N 802), C4 (0,75 mM, C/N 436) et C5 (3,9 mM, C/N 84).	173
Figure 35: (a) morphologie après 14 jours et (b) suivi de la croissance du mycélium de <i>Tver</i> en cours de culture à 27°C sur P25 modifié à différentes concentrations en azote : C0 (0M), C1 (0,11 mM, C/N 2859), C2 (0,20 mM, C/N 1649), C3 (0,41 mM, C/N 802), C4 (0,75 mM, C/N 436) et C5 (3,9 mM, C/N 84).	174
Figure 36: schéma de la chaîne respiratoire et de la chaîne respiratoire alternative des champignons filamenteux (adapté de Li et al., 2011).	184
Figure 37 : morphologies des souches <i>Tver</i> BRFM1218 et <i>Tver</i> BRFM1532 sur P25 après 14 jours de culture à 27°C.	186
Figure 38: morphologie de <i>Fmed</i> (souche <i>phco36</i>) après 2 semaines sur différents milieux de culture solides à 25 (A-E) ou 30°C (F-J). A et F: malt-agar (2-3%), B et G: P25, C et H: milieu minimal Tien and Kirk, D et I: Potatoe Dextrose Agar (PDA), E et J: malt-agar avec peptone de levure (MAYPD).	187
Figure 39: principales voies de biosynthèse des mélanines fongiques (a) 1,8-DiHydroNaphthalène (DHN)-mélanine et (b) pyomélanine (adapté de Tran-Ly et al., 2020).	188
Figure 40: structure chimique (a) du sterpurène, sesquiterpénoïde identifié dans le mycélium de <i>C. purpureum</i> et de certains de ses dérivés, aux activités phytotoxiques: (b) l'acide sterpurique et (c) le sterpurene-3,12,14 triol (Strunz et al., 1997).	192

Liste des tableaux

Tableau 1: masses de mycélium et de bois mélangés pour la préparation de la gamme par ajouts dosés	102
Tableau 2: quantités de mycélium et de poudre de bois de vigne lyophilisés mélangés pour extraction au méthanol et dosage de l'ergostérol par HPLC-UV-DAD	103

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
a_w	Activité de l'eau
BDA	Dépérissement aux <i>Botryosphaeriaceae</i> ou « Black Dead Arm »
CAZY	Enzymes impliquées dans la modification de polysaccharides (Carbohydrates Active enZymes)
C/N	Ratio carbone/azote
CMF	Réactions de Fenton (Chelator-Mediated Fenton reactions)
CO ₂	Dioxyde de carbone
CytP450	Cytochrome P450
cv.	Cultivar
DyPs	Peroxydases décolorantes
Fmed	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
GST	Glutathion transferases
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute-Performance
IC ₅₀	Indice de Concentration permettant d'inhiber 50% de la croissance
LiPs	Peroxydases à lignine
LMW	Molécules à faible poids moléculaire (Low-Weight Molecular compounds)
m/z	Ratio masse sur charge
MDB	Maladies du Bois de la Vigne
min	Minutes
mg	Milligrammes
mgC/j	Milligramme de carbone par jour
mL	Millilitres
mm	Millimètres
MnP	Peroxydase à manganèse
MS	Spectrométrie de masse
ms	Masse sèche
ng	Nanogrammes
nm	Nanomètres
•OH	Radical hydroxyle
O ₂	Dioxygène
O ₂ ^{•-}	Anion superoxyde
OH	Groupement hydroxyle
ppm	Parties par million
resp.	Respectivement
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
rpm	Tours par minute
SM	Métabolites Spécialisés
Tver	<i>Trametes versicolor</i>
UV-DAD	Ultra-Violets à Barrette de Diodes
µg	Microgrammes
µL	Microlitres

Introduction générale

Les maladies du bois de la vigne (MDB) sont une des préoccupations majeures de la filière viticole mondiale depuis les 30 à 40 dernières années (Fontaine et al., 2006). Parmi les MDB, trois sont majoritaires : l'eutypiose, associée majoritairement à l'agent pathogène *Eutypa lata*¹; le dépérissement aux *Botryosphaeriaceae* ou « Black Dead Arm » (BDA), associé à plusieurs espèces de *Botryosphaeriaceae* (Ascomycota), dont *Diplodia seriata*² et *Neofusicoccum parvum*³ parmi les plus communes ; et l'Esca, associé principalement à *Phaeomoniella chlamydospora*⁴, *Phaeoacremonium minimum*⁵, et plusieurs *Basidiomycota* dont *Fomitiporia mediterranea*⁶ (Fmed), le plus rencontré en Europe. L'estimation de leur impact économique au niveau mondial est rendue difficile par la variabilité observée entre les régions ou les pays concernés, avec des pertes de 1 à 50% reportées dans des vignobles européens, australiens ou américains (Hofstetter et al., 2012). Le coût de remplacement des pieds affectés par les MDB au niveau mondial a été estimé, et très probablement sous-estimé, à 1,1 milliards d'euros par an (Hofstetter et al., 2012). En France, un suivi mené par l'observatoire national des maladies du bois de 2003 à 2008 a permis d'estimer à 11,3% du vignoble en 2008 la superficie affectée par les MDBs (Grosman and Doublet, 2012). Cette dernière a été estimée à 13% en 2013, contre moins de 6% en 2003 (Doublet et al., 2014). Les symptômes de l'Esca et du BDA sont particulièrement difficiles à distinguer, d'autant que les deux maladies peuvent être présentes simultanément sur un même cep. C'est pourquoi leur prévalence, c'est-à-dire le pourcentage de ceps présentant des symptômes, est souvent comptabilisée ensemble pour ces deux maladies. Elle était de 3,2% en 2008 et de 5% en 2011. La tendance est donc à la hausse bien que les observations soient fluctuantes d'une année à l'autre, et fortement dépendantes de la méthode de collecte des données, de la région et de l'âge de la vigne entre autres facteurs (Fussler et al., 2008; Bruez et al., 2013). Peu de données plus récentes sont accessibles, mais les données de l'observatoire des maladies du bois de la région Val de Loire confirment ces fluctuations

¹*Eutypa lata* (Pers.) Tul. & C. Tul., 1863 (*Ascomycota*, *Diatrypaceae*)

²*Diplodia seriata* De Notaris, 1842 (*Ascomycota*, *Botryosphaeriaceae*)

³*Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & Phillips, 2006 (*Ascomycota*, *Botryosphaeriaceae*)

⁴*Phaeomoniella chlamydospora* (W.Gams, Crous, M.J.Wingfield & Mugnai) Crous & W.Gams, 1996 (*Ascomycota*, *Phaeomoniellaceae*)

⁵*Phaeoacremonium minimum* (Tulasne & C. Tulasne) D. Gramaje, L. Mostert & Crous, 2015 (*Ascomycota*, *Togniniaceae*)

⁶*Fomitiporia mediterranea* M. Fischer, 2002 (*Basidiomycota*, *Hymenochaetaceae*)

Introduction

pluriannuelles entre 2013 et 2021, et font état d'une prévalence des symptômes d'Esca et/ou de BDA comprise entre 3,3 et 7,7% du vignoble (INTERLOIRE, 2022).

L'Esca est une maladie complexe pour plusieurs raisons : elle est associée à un complexe d'agents fongiques dont chaque rôle est encore mal compris, et elle est associée également à plusieurs symptômes (Figure 1a-c), pour chacun desquels les mécanismes d'apparition ne sont pas encore clairement élucidés (Bertsch et al., 2013; Mondello et al., 2018). Parmi les symptômes les plus caractéristiques, la formation de pourriture blanche également appelée *amadou* au cœur du tronc est typique de l'Esca. L'*amadou* est associé à différentes espèces de *Basidiomycota*, qui peuvent varier notamment en fonction du continent ou du pays. Les espèces *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers., *Phellinus igniarius* (L.:Fr.) Quél. et plusieurs espèces du genre *Fomitiporia* ont été successivement considérées comme les principaux agents responsables de l'Esca (Jamaux-Despréaux and Péros, 2003). Actuellement en Europe, *Fmed* est l'espèce majoritairement identifiée dans l'*amadou* et sa présence a été corrélée aux symptômes foliaires de l'Esca (Ciccarone et al., 2004; Fischer and Garcia, 2015; Bruez et al., 2020; Del Frari et al., 2021).

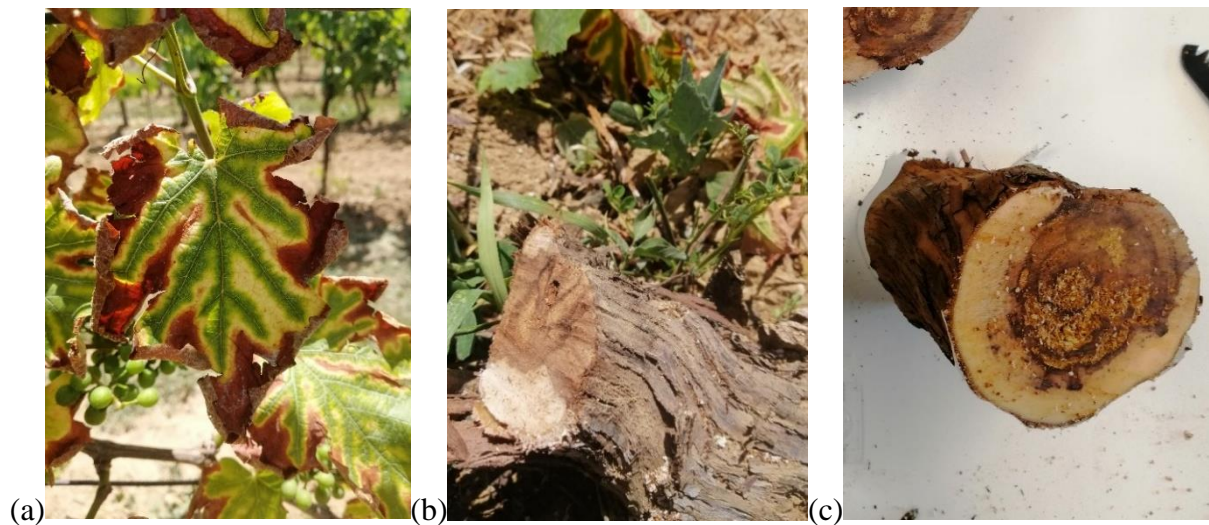


Figure 1: photographies de symptômes typiques de l'Esca : (a) "feuilles tigrées", (b) nécroses brunes dans le bois et (c) nécroses brunes accompagnées de pourriture blanche (*amadou*) (© Marion Schilling)

Les champignons dégradateurs de bois sont des champignons filamenteux, en majorité de l'embranchement des *Basidiomycota* mais également des *Ascomycota*, capables de dégrader ou de modifier les différents composés du bois : les composés structuraux (cellulose, hémicelluloses et lignine), mais également des molécules non liées aux parois cellulaires appelées extractibles. Les mécanismes mis en œuvre par les champignons dégradateurs de bois peuvent être spécifiquement adaptés à leur substrat (Krah et al., 2018). Ce phénomène d'adaptation est expliqué par le fait que les espèces se développant sur un substrat donné ont

Introduction

co-évolué avec ce substrat, et ainsi développé des mécanismes primaires ou secondaires leur permettant de continuer à se développer sur ce substrat. L'évolution des différents bois, de forêt ou de vigne notamment, et la diversité anatomique, structurale ou chimique qui en résulte, serait donc intimement liée à la diversité des micro-organismes qui leur sont associés, en particulier les champignons dégradeurs de bois. Afin de mieux comprendre cette notion et son lien avec les MDB, le chapitre d'ouvrage ci-après (Schilling et al., 2021) a pour objectif de décrire les spécificités du bois de vigne en comparaison des bois de forêt, et leurs liens avec les mécanismes de dégradation des champignons dégradeurs de bois et des champignons associés aux MDB.

1. Dégradation du bois et maladies du bois de vigne (Publication n°1)

Publication n°1: Schilling, M., Farine, S., Péros, J.-P., Bertsch, C., and Gelhaye, E. (2021). "Wood degradation in grapevine diseases," in Wood Degradation and Ligninolytic Fungi Advances in Botanical Research (ABR)., Chapter 6. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2021.05.007>.

Wood degradation in grapevine diseases

Marion Schilling^{a,*}, Sibylle Farine^b, Jean-Pierre Péros^c,
Christophe Bertsch^b, and Eric Gelhaye^a

^aUniversité de Lorraine, INRAE, IAM, Nancy, France

^bLaboratoire Vigne, Biotechnologies et Environnement (LVBE), Université de Haute-Alsace, Colmar, France

^cUMR AGAP Institut, Université de Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

*Corresponding author: e-mail address: marion.schilling@univ-lorraine.fr

Contents

1. Introduction	2
2. Grapevine wood properties	6
2.1 Wood anatomy	6
2.2 Wood chemistry	8
3. Wood defense mechanisms	11
3.1 Physical protection against fungi	11
3.2 Chemical defense	13
3.3 Molecular responses of grapevine wood to fungal attack	15
4. Wood infection by GTD fungi	16
4.1 GTD: Fungal complexes and associated fungi	16
4.2 Pathogenicity of GTD fungi	16
4.3 Lignocellulose degradation by GTD associated fungi	20
4.4 Detoxification mechanisms of GTD associated fungi	21
5. Conclusion	24
References	25

Abstract

The major Grapevine Trunk Diseases (GTD) gather diseases associated with either one particular fungal species, *e.g.*, eutypiose, or with fungal species complexes, *e.g.*, *Botryosphaeria dieback*. GTD-associated fungi are part of different fungal classes, depending on their substrate degradation mechanisms or on their lifestyles. They are identified in grapevine wood and they lead to wood typical symptoms. They are sometimes associated to foliar symptoms too, despite not found in aerial parts, probably acting through fungal toxins or through physiological disorders, such as non-functional wood vessels. Grapevine is a liana, and as such shows structural and chemical differences compared to forest tree wood. However, knowledge on wood-degrading fungi growing on tree wood can contribute to a better understanding of grapevine wood adaptation mechanisms to fungal attack. For example, wood density, xylem vessels size and number, or lignin content and composition can play a role in wood sensitivity to

fungi. Also, some fungal detoxification mechanisms against wood extractibles are host-specific. In a first part of this chapter, structure and chemical composition of grapevine wood are described, pointing out properties that might play a role in fungal growth. In a second part, GTD main associated fungi and their known mechanisms for wood degradation or wood chemical detoxification are discussed. Extracellular and intracellular enzymatic and non-enzymatic mechanisms are considered. These mechanisms, well described for their role in fungal adaptation to tree wood, have been much less studied for GTD associated fungi. Further studies about those mechanisms would contribute to understand fungal adaptation to grapevine.



1. Introduction

Wood-decay (WD) fungi are of main importance for recycling wood components in particular carbon in biogeochemical cycles and can be used as biological tools to valorize wood biomass in energy or paper industry. Conversely, they cause considerable losses in silviculture, arboriculture, or viticulture as pathogens. WD fungi can be classified depending on the way they degrade woody substrates, traduced by their ability to degrade the main wood cell wall components: cellulose, hemicelluloses, and lignin. This classification distinguishes three classes: (i) brown-rot fungi (*e.g.*, *Gloeophyllum trabeum* or *Fomitopsis pinicola*, both Basidiomycota), which degrade cellulose and hemicelluloses but not or only partially lignin, namely by dealkylation, demethoxylation or demethylation, and lead to crumbly wood residues on living or dead wood (Floudas et al., 2012; Sigoillot et al., 2012); (ii) soft-rot fungi (*e.g.*, *Phialocephala dimorphospora*, an Ascomycota), which partially degrade all three components under high moisture conditions, and lead to cell wall cavities associated with a soft appearance. Ascomycota are typically classified in this category, even if some Agaricomycetes (Basidiomycota) also induce soft-rot similar phenotypes (Sahu et al., 2021). For example, *G. trabeum* (a brown-rot fungus) or *Heterobasidion annosum* (a white-rot fungus, see below) are two Basidiomycota reported to act occasionally like typical soft-rot fungi, *i.e.*, associated with gradual degradation of tunneled orientated cellulose microfibrils of the wood cell secondary wall (type I soft-rot). Such modifications of fungal behavior may be influenced by their host lignin content, lignin molecular composition, the presence of polyphenols, wood moisture or the occlusion of cell lumina (Schwarze, 2007); (iii) white-rot fungi, which degrade all three main wood structural components and lead to a white and soft consistency. Among

white-rot fungi, some are selective and degrade lignin in priority while other are so-called simultaneous. This behavior can vary upon environmental conditions, and is species dependent, *e.g.*, *Gelatoporia subvermispora* degrades preferentially lignin in contrast to the simultaneous species *Trametes versicolor* (del Cerro et al., 2021). For instance, high nitrogen concentration in wood likely stimulates polysaccharide breakdown, while a low concentration stimulates selective lignin removal. Also, a lack of desiccation or frost may reduce mechanical stress for the wood and favor delignification (Eriksson, Blanchette, & Ander, 1990). Most of white-rot fungi belong to Basidiomycota, such as *Phanerochaete chrysosporium* or *T. versicolor* (Floudas et al., 2012; Martinez et al., 2004). Of note, some Ascomycota are also considered as white-rot fungi, such as *Xylaria* spp. or *Coccomyces* spp. (Mäkelä et al., 2015). White-rot fungi are considered as the ancestors of WD fungi, which evolved to brown-rot fungi by partly losing their genes involved in ligninolytic activity, such as lignin and manganese peroxidases. This leads to a phylogenetic continuum between white-rot and brown-rot fungi, and the distinction between those two functionally classes is still not always firmly established (Floudas et al., 2012; Nagy, Riley et al., 2017; Nagy, Tóth et al., 2017; Riley et al., 2014).

WD and in particular white-rot can also be classified according to their preferential substrate, *i.e.*, dead or living tissues. The different fungal lifestyles can be described as follows: (i) necrotrophs are able to kill living cells for subsequent saprotrophic colonization, (ii) saprotrophs subsist upon dead organic matter (Sun, Paulin, Alatalo, & Asiegbu, 2011), and (iii) biotrophs grow on living wood cells without killing them. Both necrotrophs and biotrophs can be considered as pathogens for plants, because they can lead to diseases, contrary to saprotrophs. However, from an ecological point of view, pathogens are restricted to species able to kill living cells, here corresponding to necrotrophs only. WD fungi lifestyle depends on the environmental conditions, on host physiological state, and/or on their lifecycle. This is particularly relevant for the majority of botryosphaeriaceous species, *e.g.*, *Neofusicoccum australe*, one of Grapevine Trunk Diseases (GTD) associated fungal agents, which are often identified as wood endophytes, and which can switch to a pathogenic lifestyle (Laurent et al., 2020). This switch depends on environmental conditions, and on plant microbiome or physiological state (Bettenfeld, Fontaine, Trouvelot, Fernandez, & Courty, 2020; Sakalidis, Hardy, & Burgess, 2011). Main lifestyles, hosts and localization of some typical fungi found on grapevine wood and associated with grapevine diseases are summarized in Table 1.

Table 1 Classification and main lifestyle, substrate preferences and localization of some of the main disease-associated fungi found on grapevine wood^a (Alves et al., 2014; Arzanlou et al., 2014; Berraf & Péros, 2005; Blanco-Ulate et al., 2013b; Carlucci et al., 2013; Carter, 1991; Edwards & Pascoe, 2004; Elena et al., 2006; Fischer, 2006; Gramaje et al., 2012, 2015; Guarnaccia et al., 2018; Heath et al., 2011; Kim et al., 2016; Marco et al., 2004; Marincowitz et al., 2008; Markakis et al., 2017; Mohammadi et al., 2014; Morales-Cruz et al., 2018; Pilotti et al., 2005; Rolshausen et al., 2010; Rooney-Latham et al., 2005; Schilder et al., 2005; Thomidis et al., 2011; Úrbez-Torres et al., 2008, 2013; Vico, Žebeljan, Vučković, Vasić, & Duduk, 2017).

Name	Classification	Lifestyle	Substrate	Localization	References
<i>Fomitiporia mediterranea</i> ^a	Basidiomycotae, Agaricomycota, Hymenochaetales, Hymenochaetales	White-rot	Grapevine, <i>Corylus avellana</i> , <i>Olea europaea</i> , <i>Lagerstroemia indica</i> , <i>Actinidia chinensis</i> , <i>Acer negundo</i> , <i>Citrus</i> trees, <i>Quercus</i> sp., <i>Ligustrum vulgare</i> , <i>Robinia pseudoacacia</i> , <i>Laurus nobilis</i> , <i>Platanus x acerifolia</i> , pomegranate, kumquat, silk tree	Europe (Germany, France, Italy, Greece), South Africa, USA	Elena, Fischer, Dimou and Dimou (2006), Fischer (2006), Markakis et al. (2017) and Pilotti, Gervasi, & Brunetti (2005)
<i>Phaeoacremonium minimum</i> (syn <i>P. aleophilum</i> , teleomorph <i>Togninia minima</i>)	Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycota, Diaporthales, Togniniaceae	Tracheo- mycotic	Grapevine, olive tree, pistachio tree, pome and stone fruits, <i>Cupressus sempervirens</i> , kiwi wood, apricot trees	Australia, Europe (Italy, Iran), Africa, California	Arzanlou, Narmani, Khodaei and Moshari (2014), Carlucci, Raimondo, Cibelli, Phillips and Lops (2013), Edwards and Pascoe (2004), Gramaje, Mostert, Groenewald and Crous (2015), Marco, Calzarano, Osti and Mazzullo (2004), Mohammadi, Kazemi and Farahmand (2014), Rolshausen, Wilcox and Baumgartner (2010) and Rooney-Latham, Eskalen and Gubler (2005)
<i>Eutypa lata</i>	Ascomycota, Sordariomycota, Xylariales, Diatriypaceae	Soft-rot	Grapevine, <i>Pistacia vera</i> , almond, apricot, cherry, olive, peach, walnut and non-cultivated hosts	California, Europe, Australia	Berraf and Péros (2005), Carter (1991), Mahoney et al. (2003), Péros and Berger (2003) and Rolshausen et al. (2010)

<i>Neofusicoccum parvum</i>	Ascomycota, Dothideomycetes, Botryosphaerales, Botryosphaeriaceae		Grapevine, olive trees, eucalyptus, peaches, pome and stone fruit trees, blueberry, <i>Syzygium cordatum</i> , walnut, pistachio trees, almond-tree <i>Cupressus sempervirens</i> , <i>Tibouchina</i> sp., proteaceae	Europe (Italy, Spain, Greece, Iran), California, New Zealand, South Africa, Australia	Alves, Linaldeddu, Deidda, Scanu, & Phillips (2014), Blanco-Ulate et al. (2013c), Carlucci et al. (2013), Gramaje et al. (2012), Heath et al. (2011), Marincowitz, Groenewald, Wingfield and Crous (2008), Mohammadi et al. (2014), Morales-Cruz et al. (2018), Rolshausen et al. (2010), Thomidis, Michailides and Exadaktylou (2011) and Úrbez-Torres, Leavitt, Guerrero, Guevara and Gubler (2008)
<i>Diplodia seriata</i> (anamorph <i>Botryosphaeria obtusa</i>)	Ascomycota, Dothideomycetes, Botryosphaerales, Botryosphaeriaceae	Tracheo- mycotic	Grapevine, olive tree, apple, quince fruit, <i>Fraxinus</i> spp.	Europe (Spain, Italy, Portugal), California, Mexico	Alves et al. (2014), Kim, Kwak, Aguilar and Xiao (2016), Morales-Cruz et al. (2018), Úrbez-Torres et al. (2008), Úrbez-Torres, Peduto, Vossen, Krueger and Gubler (2013) and Vico et al. (2017)
<i>Phomopsis viticola</i> (teleomorph <i>Diaporthe ampelina</i>)	Ascomycota, Sordariomycota, Diaporthales, Diaporthaceae		Grapevine	Algeria, America, Europe	Berraf and Péros (2005), Guarnaccia et al. (2018) and Schilder, Erincik, Castlebury, Rossman and Ellis (2005)
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	Ascomycota, Sordariomycota, Diaporthales, Togniniaceae	Tracheo- mycotic	Grapevine	Australia, Africa, California, Europe	Edwards and Pascoe (2004); Rolshausen et al. (2010) and Rooney-Latham et al. (2005)

³As *Fomitiporia mediterranea* was sometimes wrongly reported as *Phellinus ignarius*, *P. punctata* or *Fomitiporia punctata* (Fischer, 2002), information about *F. mediterranea* ecology can be incomplete. Namely, *F. punctata* was described as growing on forest deciduous trees, and even forming basidiocarps, described as woody and difficult to separate from the substrate (Jang et al., 2016). Although rarely encountered on living grapevine wood, basidiocarps of *F. punctata* have been described on dead vine trunk and branches (Mugnai et al., 1999).

Among WD fungal pathogens, those associated with GTD are of main economic importance, causing up to 13% of the French vineyard unproductivity in 2013 (Bruez et al., 2014). The three main GTD are esca disease, Botryosphaeria dieback, and eutypiose. They are mainly associated with respectively (i) the two Ascomycota *Phaeoacremonium minimum* and *Phaeomoniella chlamydospora*, and the Basidiomycota *Fomitiporia mediterranea* (previously *F. punctata*), (ii) the Ascomycota *Neofusicoccum parvum* and *Diplodia seriata*, and (iii) the Ascomycota *Eutypa lata*. Typically characterized by wood necrosis, GTD are sometimes associated with foliar symptoms too. The mechanisms leading to foliar symptoms are still not fully understood and may be linked to transported secreted molecules or to physiological damages in wood (Ramírez-Suero et al., 2014). One recent hypothesis is that wood microbial associations, including bacterial and fungal species, are required to observe GTD symptoms (Bruez et al., 2020).

To degrade wood as well as to face to wood defense chemicals, WD fungi involve enzymatic or non-enzymatic mechanisms (Deroy et al., 2015). All proteins secreted in the hyphal environment at a given time are called secretome, including small secreted proteins, proteins anchored to the membrane, and cell wall or intrinsic membrane proteins (Alfaro, Oguiza, Ramírez, & Pisabarro, 2014). To counter wood defense chemicals, WD fungi are also able to degrade or modify toxic molecules. Detoxification enzymes constitute the so-called xenome, and are notably represented by the intracellular Cytochrome P450 monooxygenase (cytP450) and Glutathione transferase (GST) families (Morel et al., 2013).

In the present chapter, the term adaptation is used to describe fungal intrinsic ability to grow in a specific ecological niche. In particular, the comparison between tree and grapevine woods, and their associated fungal species, could be informative to tip the scale in favor of a species specificity and/or fungal adaptative traits that explain development of fungi on each wood type. To discuss this hypothesis, grapevine wood and forest tree wood structural and chemical properties will be described in a first part. The second part will then focus on WD fungal mechanisms, involved in fungal adaptation, including extracellular and intracellular enzymatic and non-enzymatic activities.



2. Grapevine wood properties

2.1 Wood anatomy

Wood is constituted by secondary xylem tissue, comprising parenchyma cells and conduits (vessels or tracheids). The latter are differentiated from

xylematic or phloematic precursor elements generated by the bilateral meristematic activity of vascular cambium. They are dead cells characterized by a lumen and a wood cell wall, the latter constituted by a secondary cell wall and the remaining primary cell wall. The secondary cell wall is divided in three successive layers, containing more lignin, and contributing to sieve transport, plant rigidity and resistance. Parenchyma cells are living thin-walled cells able to react against environmental stress. As shown by UV-microscopy observations, parenchyma cells seem to be more resistant against brown-rot than fibers, due to their cell wall morphology (Schwarze, 2007). For tree wood, species with low parenchyma contents (e.g., *Picea abies* and *Betula pendula*, containing 5–10% of parenchyma cells) were more sensitive to brown-rot degradation than species containing higher parenchyma contents (35–40%) (e.g., *Quercus* sp. or *Robinia pseudoacacia*). On the contrary, white-rot fungi preferentially degrade wood species rich in parenchyma cells. Parenchyma cell walls are characterized by no radial cellulose microfibrils, contrary to fibers and tracheid cells, which probably facilitate fungal degradation at least by brown-rot fungi (Schwarze, Fink, & Deflorio, 2003). From our best knowledge, no information was found to date about such an impact of cell wall structure on white-rot fungi growth. Wood properties such as ring-width, vessel number and size, or cell structural arrangements are also involved in host-sensitivity to fungi, probably by facilitating the hyphal penetration, and playing a role in host defense mechanisms (Schwarze et al., 2003; Torelli, Krizaj, & Oven, 1994). After penetration, the mycelium of white-rot fungi usually colonizes the xylem through simple or bordered pits by enlarging them and forming boreholes, through the activity of their ligninolytic enzymes.

Grapevine wood has different anatomical and morphological characteristics than tree wood, because it grows on stakes and does not need to stand by itself (Casieri, Hofstetter, Viret, & Gindro, 2009). For example, xylem vessels in woody lianas such as grapevine or *Actinidia chinensis* are known to be larger than in other hardwoods to support higher flow rates. Vessel diameters observed in grapevine wood are ranged between 60 to more than 120 μm , depending on the cultivars (cv.) and the year (Pouzoulet, Scudiero, Schiavon, & Rolshausen, 2017). In comparison, vessel diameters of *Quercus rubra* (ring-porous species) and *Acer saccharinum* (diffuse-porous species) ranged between 30–100 μm and 50–60 μm respectively (Ellmore, Zanne, & Orians, 2006). Narrower vessels are considered to confer a better resistance to cavitation, and lianas generally have narrower vessels for a stem length than self-supporting trees (Olson & Rosell, 2013). Grapevine vessel diameters are larger than the spores of identified fungal pathogens, which is consistent

with a rapid colonization. A higher number of vessels in the xylem zone of grapevine cv. “Humagne” is correlated with a higher number of fungal pathogens species in healthy grapevine wood (Casieri et al., 2009). Moreover, larger vessel diameters are correlated with a higher sensitivity to fungal pathogens, in particular to *P. chlamydospora* (Pouzoulet et al., 2020).

2.2 Wood chemistry

Cellulose, hemicelluloses, and lignin are closely nested together constituting the wood cell wall. Chemical and biological properties of these polymers have been described (Chen, 2014). Cellulose is an homopolysaccharide composed of β -(1 \rightarrow 4) linked D-glucopyranose units (Fig. 1A), whereas hemicelluloses are heteropolysaccharides of various units such as glucomannans (Fig. 1B), arabinogalactans or glucans. The composition of

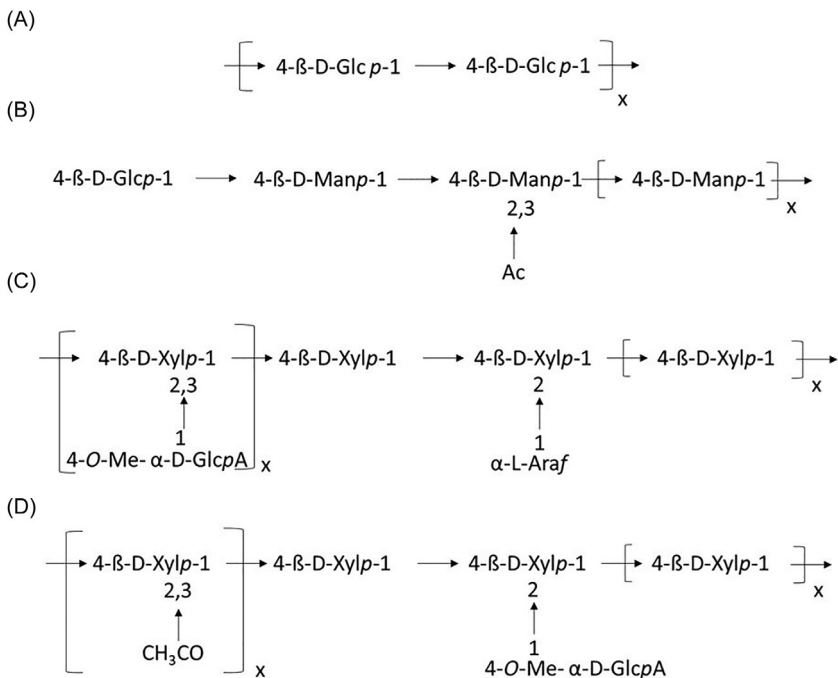


Fig. 1 Structure of (A) cellulose, and the three hemicelluloses (B) glucomannan, found in both hardwoods and softwoods, composed of mannopyranose (Manp) and glucopyranose (Glcp) units, (C) acetylglucuronoxylans, characteristic to hardwoods, composed of xylopyranose (Xylp) and methylglucuronic acid (4-O-Me- α -D-GlcpA) units, with acetyl (CH₃CO) ramifications, and (D) arabinoglucuronoxylans, characteristics to softwoods, composed of Xylp and 4-O-Me- α -D-GlcpA units, with arabinofuranose (Araf) ramifications.

hemicelluloses varies namely according to wood type. In hardwood, hemicelluloses are mainly constituted of acetylglucuronoxylans (Fig. 1C) and glucomannans, whereas in softwood hemicelluloses main constituents are galactoglucomannans, glucomannans and arabinoglucuronoxylans (Fig. 1D) (Laine, 2014).

Lignin content in wood, particularly in vessels, plays an important role in host-resistance against white-rot (Schwarze, 2007). Briefly, lignin is an aromatic-based complex association of three main units: the coniferyl alcohol or Guayacyl (G)-unit, the sinapyl alcohol or Syringyl (S)-unit and the *p*-coumaryl alcohol or *p*-Hydroxyphenyl (H)-unit (Fig. 2) in different proportions depending on wood type (Mäkelä et al., 2015) and on cell type (Bagniewska-Zadworna, Barakat, Łakomy, Smoliński, & Zadworny, 2014). This particularly exemplified by the fact that monocotyledons (Graminae) contain all three units constituting the lignin, whereas dicotyledons do not contain H units. Among the latter, gymnosperms (softwoods) contain mainly G units, whereas angiosperms (hardwoods) contain both G and S units (Higuchi, 2003). The S/G ratio in different hardwood species varies from 1.06 (i.e., in *Acacia mangium*) to 3.10 (i.e., in *Eucalyptus globulus*) (Santos, Capanema, Balakshin, Chang, & Jameel, 2012). Interestingly, the proportions of these lignin units influence host-sensitivities to WD fungi. Indeed, a higher content in G unit, characteristic to softwoods, is related to a higher resistance to soft-rot and more generally to WD fungi. Some hardwood species containing more S units, such as *Fraxinus* sp., *Acer pseudoplatanoides* or *Aesculus hippocastanum* are less resistant to WD (Schwarze, 2007).

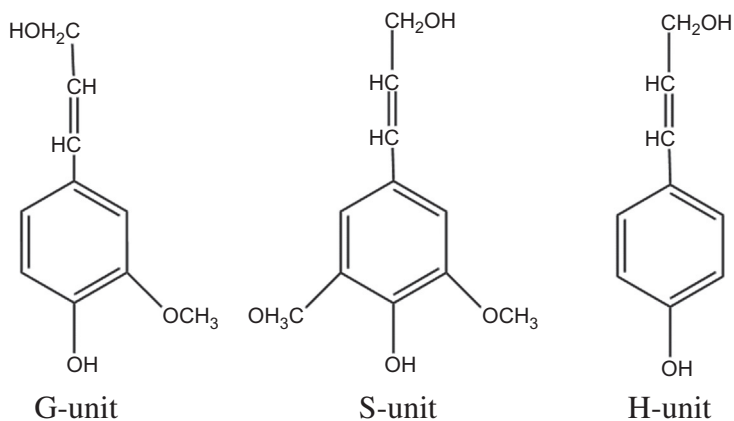


Fig. 2 The three lignin units found in wood: coniferyl alcohol or guayacyl (G)-unit, sinapyl alcohol or syringyl (S)-unit and *p*-coumaryl alcohol or *p*-hydroxyphenyl (H)-unit.

Table 2 Main wood components of different wood types (approximative mean content) (Agrelli et al., 2009; Howard et al., 2003; Tarasov et al., 2018).

Component	Proportion in hardwoods	Proportion in softwoods	Proportion in grapevine wood (cv. "Sangiovese")
Cellulose	33–55%	38–51%	45.4% ± 2.2
Hemicelluloses	22–40%	18–38%	20.3% ± 2.2
Lignin	18–32%	21–35%	12.1%

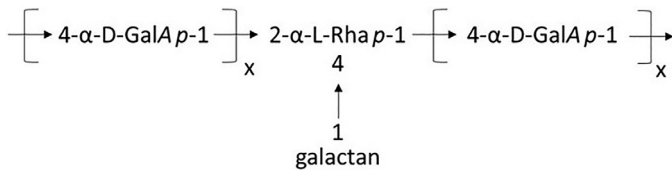


Fig. 3 Structure of rhamnogalacturonan, a pectin composed of rhamnopyranoses (Rhap), galactopyranose (Galp) units, with galactan ramifications.

Mean lignin and polysaccharides contents measured in hardwoods, softwoods, and in the sole reported grapevine wood cultivar so far are provided in Table 2 (Agrelli, Amalfitano, Conte, & Mugnai, 2009; Howard, Abotsi, van Jansen, & Howard, 2003; Tarasov, Leitch, & Fatehi, 2018).

Grapevine wood contains less lignin proportion compared to tree wood, in accordance with its liana morphological characteristics. Moreover, within a given species, wood component proportions can also vary under stress conditions, such as fungal infection (Markakis et al., 2019).

Wood cell wall also contain pectins, other heteropolysaccharides composed of rhamnogalacturonans, galactans and arabinans (Fig. 3). Despite the weak percentages of pectins (<4%) in wood regardless the species, the fungal ability to degrade them may play an important role for colonization, namely by pits membrane hydrolysis. Pectins degradation mechanisms by fungi have been studied in details (Schwarze, 2007). For example, oxalic acid and polygalacturonases production are particularly relevant strategies used by fungal pathogens. Oxalic acid, by lowering the pH around hyphae, is competing with pectins to chelate Ca^{2+} ions, in detriment of pectins. Thus, solubilized pectins are then more available to be degraded by fungal polygalacturonases, through β -1,4 linkages hydrolysis (Schwarze, 2007).

In grapevine, starch is the main form of carbon reserves and is localized in parenchyma ray. Its concentration varies between 10% and 30% dry weight (dw), in canes and trunk respectively, during dormancy or in roots.

It is markedly mobilized by canes and roots through the sap between first leaves and early bloom stages (Zapata, Deléens, Chaillou, & Magné, 2004).

While wood constitutes an important source of carbon for fungi, it is very poor in other nutrients, such as nitrogen. Nitrogen was estimated to 0.01–0.3% dw in hardwoods, to 0.6–0.7% dw in grapevine trunk and to 1.5% dw in grapevine canes or roots (Celette, Findeling, & Gary, 2009; Zapata et al., 2004). Most WD fungi require only small amounts of nitrogen (less than 0.1%), with a probable specie-specific optimum for carbon intake (Allison et al., 2009). Adaptation to low-nitrogen conditions varies among fungal species and mechanisms such as the recycling of amino-acids from proteins when the cell enters in senescence play an important role in fungal nitrogen utilization (Elisashvili, Kachlishvili, & Penninckx, 2008; Guettler et al., 2003; Mikiashvili, Elisashvili, Wasser, & Nevo, 2005; Reid, 1979). Moreover, the nature of carbon or nitrogen source influences fungal behaviors (Elisashvili et al., 2008; Mikiashvili et al., 2005; Vanden Wymelenberg et al., 2011). Indeed, only a few WD fungi can assimilate oxidized forms of nitrogen such as nitrate (Guettler et al., 2003). Nitrogen reserves in grapevine, mainly under amino-acid such as arginine form, play an important role namely before flowering, as intake by roots is significantly lower (Zapata et al., 2004).

A lower availability in nutrients such as nitrogen, potassium and magnesium in the trunk, for example, under water stress or other stress conditions, favors the transport of sugars from trunks and branches to fruits and is positively correlated with less esca symptoms. On the contrary, higher calcium levels, which is involved in middle lamellae and membrane strength and in plant stress responses, are negatively correlated with esca symptoms (Calzarano, Amalfitano, Seghetti, & Cozzolino, 2009).



3. Wood defense mechanisms

3.1 Physical protection against fungi

Wood durability is defined as its natural capacity to resist to wood decay. Wood density, defined as the dry mass for a given volume of wood, has been correlated with wood durability and thus may be involved in WD resistance (Perrot et al., 2020). As living tissue, wood is also able to react to biotic or abiotic stresses, such as wounding or fungal attack. To describe this reaction, the Compartmentalization Of Decay In Trees (CODIT)-model (Shigo, 1984) distinguishes four walls in the reaction zone. Walls 1–3 correspond to the first barrier to infection or injury. They are previously formed in

wood, and are a still functional but altered discolored zone. They are respectively characterized by (1) xylem vessels occlusion by tyloses or gums, which constitute a vertical barrier to infection, which is the weakest barrier of the three walls, (2) the last layers cells of the vascular cambium in the annual ring, which forms a radial barrier, and (3) rays cells, which form a tangential barrier, and the strongest of the three first zones (Pouzoulet, Jacques, Besson, Dayde, & Mailhac, 2013). After wood injury, a fourth wall, also called the barrier zone, is generated from the cambium, and is rich in wood defense chemicals. It is interesting to notice here that some fungi are able to bypass the barrier zone without provoking wood defense mechanisms such as the formation of another barrier zone further away in wood (Schwarze, 2007).

Grapevine wood shows no differentiated heartwood, even in 21 years old stems (Braun & Schmid, 1999). Its fascicular xylem has no apotracheal parenchyma cells and is instead constituted only by fibers. Living parenchyma cells accumulate lignin in their cell walls in the reaction zone. Interestingly, grapevine xylem fibers are able to modify their cell wall after a wound or a fungal attack, namely by depositing suberin, thus creating the reaction zone despite the absence of living parenchyma cells (Pouzoulet et al., 2013). However, brown-red wood and black streaks due to esca disease in cv. “Sangiovese” were associated with respectively 6% and 30% less hemicelluloses, and 50% and 250% more lignin, compared to asymptomatic wood. This is consistent with the fact that two of the main fungi associated with esca brown and black necrosis, *P. chlamydospora* and *P. minimum*, are tracheomycotic fungi colonizing grapevine xylem vessels, and have no ligninolytic activity (Agrelli et al., 2009; Del Frari et al., 2019).

Gums and tyloses are chemical and physical barriers respectively constituted by phenolic compounds or by cell excrescences occurring in wood vessels and sometimes in tracheids in reaction to stress. Their formation mechanisms have been reviewed (De Micco, Balzano, Wheeler, & Baas, 2016). With less importance, calloses are polysaccharide accumulations occluding phloem or xylem vessels, often occurring before dormancy and thus protecting the plant against winter embolism (Aloni, Raviv, & Peterson, 1991).

Tyloses in grapevine xylem vessels naturally occur and permit to deal with seasonal temperature variations and winter frost. They constitute a first barrier against wound or fungal attack, and newly formed tyloses are observed in the reaction zone, especially in the wall 3 of CODIT-model after *P. chlamydospora* inoculation on *Vitis vinifera* cv. “Cabernet Sauvignon” canes (Pouzoulet et al., 2013). Tyloses have been shown to not only occlude

xylem vessels in grapevine, but also to induce changes in wood cell wall, and to be related to changes in phenolic compounds around them. After *P. chlamydospora* and *P. minimum* infection, condensed tannins with cyanidin as the main linked flavonoid, and resveratrol are among the major identified phenolic compounds in root xylem tissues of *V. vinifera* cv. “Flame” (Del Rio et al., 2001). Vessels adjacent to parenchyma cells, structurally specialized and called vessel-associated cells, are also modified in reaction to *E. lata* in *V. vinifera* trunk (Rudelle, Octave, Kaid-Harche, Roblin, & Fleurat-Lessard, 2005). Indeed, vessel-associated cells morphology and the organization of nutrients storage of trunk and canes of *V. vinifera* are affected by *E. lata* infection. No starch is detected in ray and fiber cells of the infected trunk, contrary to healthy trunk, and the fungal hyphae are detected firstly in vessel lumens, adjacent to cell walls, and in fiber lumens and cell walls. In a second time organelles in vessel-associated cells are degraded and cells become empty and finally invaded by hyphae too (Rudelle et al., 2005). Cell enlargement, vacuolization and flavanol globules formation are other reported changes after fungal infection (Bruno & Sparapano, 2006b).

3.2 Chemical defense

Extractives are small molecules non-linked to wood cell wall that are extractible with solvents, produced in wood and often associated with antifungal and antimicrobial properties. They can be distinguished in two categories: aliphatic and alicyclic compounds (*e.g.*, terpenic compounds, fatty acids, and alkanes) or phenolic compounds (*e.g.*, flavonoids, stilbenes, tannins, and simple phenols). Antifungal wood extractives mechanisms include anti-scavenging activities, fungal wood degradative enzymes inhibition, fungal cell wall and plasma membrane disruption or ion homeostasis, and chaotropicity perturbation (Broda, 2020; Valette, Perrot, Sormani, Gelhaye, & Morel-Rouhier, 2017).

Extractives can be specific to wood species, and are differentially localized in wood. In some tree species the central part of the trunk section is differentiated from the peripheral part. The latter, called sapwood, is composed of living cells, opposite to heartwood which is composed of dead cells and nonfunctional conducting tissues. Heartwood often constitutively accumulates extractives, depending on wood species. Oak, for example, possesses a heartwood rich in extractives such as tannins and other polyphenols. It can be noticed here that beech, for example, has the particularity to show no heartwood, but a false heartwood, composed by oxidized parenchyma

cells or dead cells. Those appears after a ripewood stage of small area with lower moisture content and lower parenchyma cells vitality. Sapwood can contain previously synthesized wood extractives, such as ellagitannins in *Quercus* sp. and *Castanea* sp., or gallic acid and catechin in *Acer* sp. It can also accumulate or newly synthesize such secondary metabolites in response to biotic or abiotic stress (Bruno & Sparapano, 2006b). Of note, tropical tree species have a higher density of these compounds in their heartwood than in their sapwood, which can contribute as well to explain a higher resistance to fungi in heartwood (Lehnebach et al., 2019).

Fourteen wood secondary metabolites belonging to the stilbene class have been identified and quantified in healthy and diseased wood of *V. vinifera* cv. “Sangiovese” (Amalfitano et al., 2011). The major stilbenes are viniferins, including resveratrol and ϵ -viniferin (Fig. 4A and C), whereas α -viniferin (Fig. 4D) is more abundant in healthy wood. Pterostilbene (Fig. 4B), phenolics and glycolic acid are also reported, and benzoic acid derivatives and flavonols are described as particularly relevant in grapevine, especially for red grape cultivars, in seed coat and epicarp of grapes.

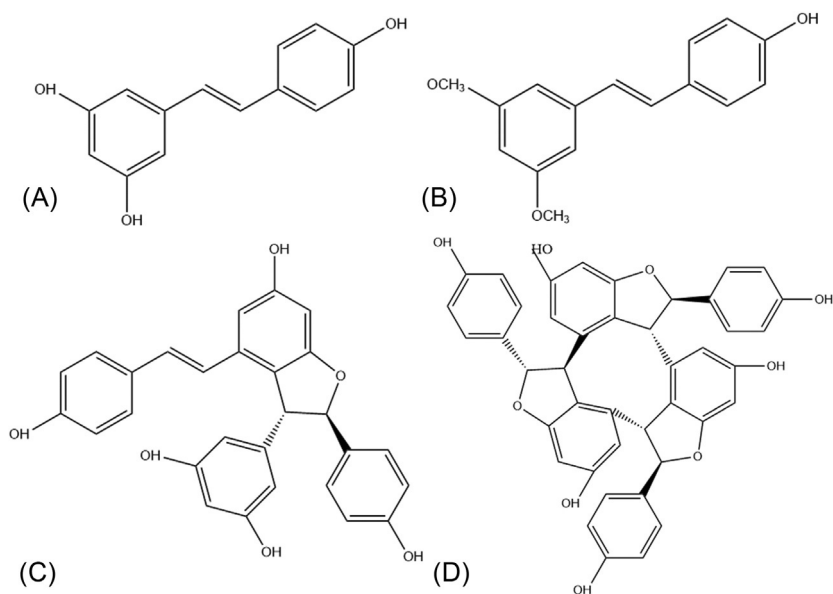


Fig. 4 Main stilbene compounds found in grapevine wood: (A) resveratrol, (B) pterostilbene, (C) ϵ -viniferin, and (D) α -viniferin.

3.3 Molecular responses of grapevine wood to fungal attack

Proteomic studies on grapevine wood from vines showing aerial and/or wood esca symptoms show an over-expression of proteins involved in cell rescue and defense in symptomatic wood compared to control wood (*i.e.*, wood from vine with nor aerial neither wood symptoms). In particular, small heat shock proteins, proteins involved in the antioxidant system such as superoxide dismutase or major latex protein, and in the defense responses, such as Pathogen-Related (PR) proteins, as well as other stress-induced proteins, such as *s*-adenosylmethionine synthetase, involved in polyamines and ethylene synthesis, are suggested to be involved in wood defense reaction. These observations are confirmed by transcriptomic analysis on wood necrosis: among other, genes encoding for thaumatin-like proteins (belonging to PR-5 proteins), known for their antifungal activities, endochitinases and β -1,3-endoglucanases, which depolymerize fungal polysaccharides and cell walls, are induced (Fontaine et al., 2016; Magnin-Robert et al., 2014; Spagnolo et al., 2012).

The phenological stage of the vine is one of the factors playing a role in stem response after a stress. Proteins involved in stress responses are repressed during flowering stage in *V. vinifera* cv. “Mourvèdre” wounded or inoculated with *D. seriata* or *N. parvum*, probably because of its high energy requirement at flowering. Among others, proteins involved in gamma-aminobutyric acid and methionine synthesis pathway, PR-10 protein, heat-shock proteins, and chaperonins are particularly up-regulated during growing stage, in accordance with a better resistance to pathogens (Spagnolo et al., 2014).

Finally, grapevine species or cultivars are not equally resistant to fungal infection. The *in vitro* molecular responses of *V. vinifera* and *V. rupestris* living cells to fungal proteins secreted by *D. seriata* and *N. parvum* are different. Callus cultures of *V. vinifera* cv. “Chardonnay” in presence of fungal proteins induced gene expression involved in phytoalexin production, in pathogenesis hypersensitivity response or in flavonoid synthesis (Bénard-Gellon et al., 2015). Extracellular medium alkalization, cell death, expression of PR genes and induction of phytoalexins synthesis such as δ -viniferin were observed on *V. rupestris* and *V. vinifera* cv. “Gewürztraminer” suspension cells in reaction to fungal secreted proteins. After fungal inoculation on canes, *V. rupestris* showed smaller necrosis than *V. vinifera* cv. “Gewürztraminer,” suggesting a higher resistance capacity for the wild species *V. rupestris* (Stempien et al., 2018).



4. Wood infection by GTD fungi

4.1 GTD: Fungal complexes and associated fungi

Among the three main GTD, eutypiose is associated with one major fungal agent, *E. lata*, whereas Botryosphaeriae dieback and esca are associated with fungal complexes. Esca has the singularity to show not only brown wood necrosis, but also white-rot, also called amadou. This disease is mainly associated with the three fungi *P. chlamydospora*, *P. minimum* and *F. mediterranea*, even if other fungal species are identified in symptomatic wood too, such as *E. lata*. The three main esca-associated fungi caused esca symptoms in wood and leaves, both when inoculated independently or in combination, *in planta* and *in vitro* (Bruno & Sparapano, 2006a, 2006b; Feliciano, Eskalen, & Gubler, 2004; Sparapano, Bruno, & Graniti, 2000). Esca wood symptoms are characterized by (i) dark brown central necrosis, mainly associated with *P. chlamydospora*, *P. minimum* and in a fewer extend *E. lata*, (ii) black spots corresponding to occluded vessels, mostly associated with *P. chlamydospora* and (iii) white-rot, also called amadou, where *F. mediterranea* is the most represented of the identified species (Péros, Berger, & Jamaux-Despréaux, 2008). In a lesser extent, other Basidiomycota species such as *Fomitiporia polymorpha*, *Tropicoporus texanus* and *Coprinellus radians* are also associated with trunk large brown lesions (Brown, Lawrence, & Baumgartner, 2020). Regarding foliar symptoms, Koch's postulate, which considers that a given pathogen causes a given symptom or disease, is not always established for the main esca associated fungi (Claverie, Notaro, Fontaine, & Wery, 2020), and for example, *F. polymorpha* and *T. texanus* are also associated with foliar symptoms close to esca symptoms, when associated with *P. chlamydospora* (Brown et al., 2020). Moreover, the occurrence and the succession of different fungal species in the wood may reveal differential capacities for the detoxification of wood toxic components, and may be necessary for the colonization by some species such as *F. mediterranea* (Mugnai, Graniti, & Surico, 1999).

4.2 Pathogenicity of GTD fungi

4.2.1 Fungal secreted proteins

Several proteins secreted by fungi are known for their role in pathogenicity. For example, metacaspases are cysteine-dependent proteases involved in programmed cell death in plants, bacteria and fungi (Tsiatsiani et al., 2011). These proteins were identified in *E. lata*, *N. parvum* and

F. mediterranea. In the latter, one metacaspase called FmMCA1 might predominantly regulate cell death in grapevine wood (Gong, Chong, Farine, & Bertsch, 2019). Furthermore, extracellular proteins secreted by *D. seriata* and *N. parvum*, two species involved in Botryosphaeria dieback on grapevine, were shown to induce stress responses in *V. vinifera* and *V. rupestris* calli cultures, such as extracellular pH increase, reactive oxygen species production and stilbenes synthesis (Bénard-Gellon et al., 2015).

4.2.2 Fungal secreted metabolites

Fungal colonization can also be related to the secretion of non-proteinaceous metabolites or small free RNAs, together referred as non-proteinaceous effectors (Collemare, O'Connell, & Lebrun, 2019). Furthermore, pathogenic fungi are able to secrete secondary metabolites mainly belonging to peptides, polyketides, peptide-polyketide hybrids, terpenes and alkaloids (Nagy, Riley, et al., 2017; Nagy, Tóth, et al., 2017). Some of them are known for their pathogenic activity. For instance, Necrosis and Ethylene Inducing Proteins, also called Nep1-Like Proteins (NLP), were identified in Ascomycota. NLP identified in *N. parvum* cause plant leaves necrosis and cell death. Of note, NLP have been shown to induce pathogenesis only in dicotyledonous plants. A lack of a specific receptor in monocotyledons may explain their resistance (Nazar Pour et al., 2020). Other fungal secreted metabolites, such as aromatic compounds or polysaccharides, are phytotoxic and involved in fungal wood colonization (Andolfi et al., 2011). Main reported grapevine fungal toxins are given in Table 3.

The two naphthalenones pentaketides scytalone and isosclerone (Fig. 5A and B), as well as the α -glucan polysaccharides family of pullulans (Fig. 5C) are phytotoxins secreted by *P. chlamydospora* and *P. minimum*. Pentaketides might be involved as intermediates in fungal melanin biosynthesis pathway, which plays a key role in fungal survival during infection (Bruno & Sparapano, 2006a; Gómez & Nosanchuk, 2003).

Eutypine, or 4-hydroxy-3(3-methyl-3-butene-1-ynyl)-benzaldehyde (Fig. 6A), is a toxin produced by *E. lata*. Toxic mechanisms of eutypine in grapevine are well described (Deswarte, Canut, Klabe, Roustan, & Fallot, 1996; Wagschal, Abou-Mansour, Petit, Clement, & Fontaine, 2008). Briefly, it is supposed to be secreted in the trunk and transported through the sap to upper parts of the plant. It penetrates cell through passive diffusion, accumulates in cytoplasm, probably interacts with the respiration chain and the plant mitochondria, and can be enzymatically reduced to non-toxic eutypinol. The isolated compound was shown to initiate a loss

Table 3 Main reported secreted metabolites of fungal grapevine trunk disease agents (Abou-Mansour et al., 2015; Andolfi et al., 2011; Bénard-Gellon et al., 2015; Burruano et al., 2016; Djoukeng et al., 2009; Evidente et al., 2010; Magnin-Robert et al., 2016; Molyneux et al., 2002; Octave et al., 2009; Ramírez-Suero et al., 2014; Rudelle et al., 2005; Stempien et al., 2018; Tabacchi et al., 2000; Wagschal, Abou-Mansour, Petit, Clement, & Fontaine, 2008).

Name	Secreted metabolites	References
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	Dihydroactinolide, 6-formyl-2,2-dimethyl-4-chromanone, 4-hydroxybenzaldehyde, 6-methoxymellein, 2,2-dimethyl-4-oxochroman-6-carbaldehyde	Andolfi et al. (2011) and Wagschal et al. (2008)
<i>Phaeoacremonium minimum</i> (syn <i>P. aleophilum</i> , teleomorph <i>Togninia minima</i>)	Scytalone, isosclerone, cis-4-hydroxyscytalone, 1,3,8-trihydroxynaphthalene, 2,4,8-trihydroxytetralone (THT), 3,4,8-THT, 2-hydroxyjuglone (HJ), 3-HJ, flavioline, 4-hydroxybenzaldehyde, pullulan (exopolysaccharide), polypeptides	Andolfi et al. (2011) and Wagschal et al. (2008)
<i>Eutypa lata</i>	Eutypine, 4-hydroxy-3-(3-methylbut-3-ene-1-ynyl) benzaldehyde, eutypinol, <i>o</i> -methyleutypine, <i>o</i> -methyleutypinol, other eutypine oxidized forms such as eutypinic acid, sicccayne, eulatinol, epoxidized chromanones, epoxy cyclohexane, eulatachromene, (<i>R</i>)-mellein and its derivative (polyketides), other polypeptides, especially acetylenic compounds	Magnin-Robert et al. (2016), Molyneux et al. (2002), Octave et al. (2009), Rudelle et al. (2005) and Wagschal et al. (2008)
<i>Neofusicoccum parvum</i>	Mellein and analogous, isosclerone, tyrosol, (3 <i>R</i> -4 <i>R</i>)-4-hydroxy- and (3 <i>R</i> -4 <i>S</i>)-4-hydroxymellein, terreutin and analogous, asperlin and analogous, salicylic acid and analogous, A and D botryosphaerones, small secreted proteins, low-weight lipophilic compounds, exopolysaccharides	Abou-Mansour et al. (2015), Bénard-Gellon et al. (2015), Burruano et al. (2016), Djoukeng, Polli, Larignon and Abou-Mansour (2009), Evidente et al. (2010), Armengol et al. (2008), Ramírez-Suero et al. (2014) and Stempien et al. (2018)
<i>Diplodia seriata</i> (anamorph <i>Botryosphaeria obtusa</i>)	Mellein, (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-4-hydroxymellein, (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)- <i>cis</i> -4,7-dihydroxymellein, (3 <i>R</i>)-7-hydroxymellein, small secreted proteins	Bénard-Gellon et al. (2015), Djoukeng et al. (2009), Ramírez-Suero et al. (2014) and Stempien et al. (2018)
<i>Phaeoconiella chlamydospora</i>	Scytalone, isosclerone, (s)-4-hydroxyphenyllate, 3-(3-methyl-2-butenyloxy)-4-hydroxybenzoate, 4-hydroxybenzoate, pullulan, unknown polypeptide, tyrosol, 3-phenyl lactic acid, 2-(3-methylbut-2-enyloxy) benzene-1,4-diol, 1- <i>O</i> -methyl-emodin, pullulan (exopolysaccharide), 4-hydroxybenzaldehyde, tyrosol, 1- <i>O</i> -methylnedonine, 3-hydroxy-5-decanolide, (<i>S</i>)-4-hydroxyphenyllactic acid, 4-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyloxy)-benzoate	Andolfi et al. (2011), Tabacchi, Fkyerat, Poliart and Dubin (2000) and Wagschal et al. (2008)

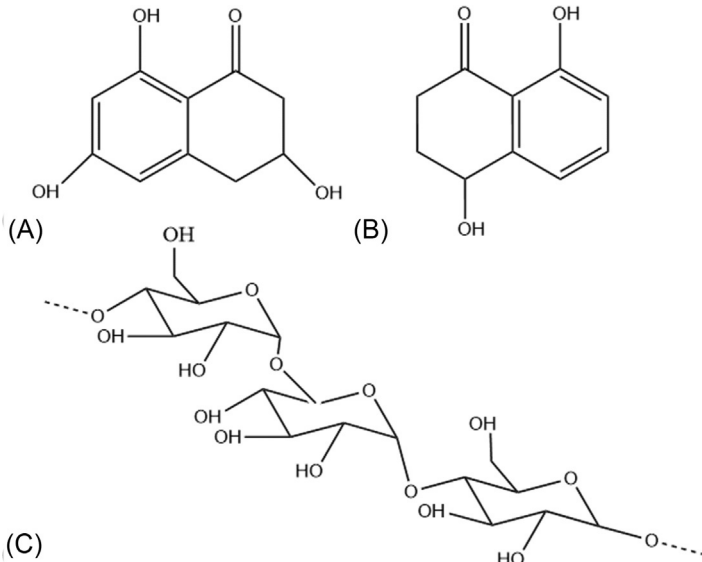


Fig. 5 Structure of (A) isosclerone, (B) scytalone and (C) pullulan.

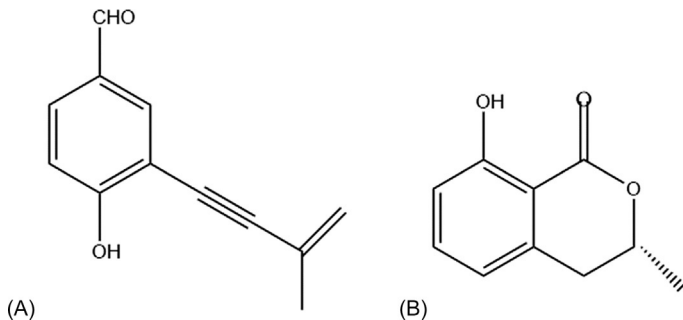


Fig. 6 Structure of (A) eutypine and (B) (*R*)-mellein, isolated from *E. lata* secretome.

of turgor in petioles, chlorosis in leaf tissues and the absence of rootlets initiation in excised canes (Rudelle et al., 2005). Polyketides such as (*R*)-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methylisocoumarin, also-called (*R*)-mellein (Fig. 6B), and its derivatives, or unidentified polypeptides from *E. lata* are particularly relevant as diagnostic markers for eutypiose (Octave, Fleurat-Lessard, & Roblin, 2009). In particular, mellein is a characteristic toxin secreted by *Botryosphaeriaceae* species, such as *N. parvum* or *D. seriata*. However, *in vitro* virulence tests with isolated mellein suggest that the toxin is probably not responsible, at least not alone, for fungal pathogenicity (Ramírez-Suero et al., 2014).

Genes encoding for proteins involved in the secondary metabolism (e.g., polyketide synthases, non-ribosomal peptide synthases, and terpene synthases), are closely related to pathogenicity or virulence. For example, a high number of terpene synthase and type 1 polyketide synthase genes clusters are observed respectively in the genomes of Basidiomycota as *Stereum hirsutum* and *F. mediterranea*, and Ascomycota (Morales-Cruz et al., 2015). Transcriptomic analysis conducted on *N. parvum* *in vitro* and *in planta* on *V. vinifera* “Cabernet Sauvignon,” and on *P. minimum* *in vitro*, further contribute to understand fungal virulence mechanisms. Namely, gene clusters involved in key biosynthetic pathways, such as polyketide synthesis, non-ribosomal peptide synthesis, indole, terpene and phosphonate synthesis, or in nutrient uptake (e.g., cellular transporters), are considered as virulence-factors (Massonnet, Morales-Cruz, Figueroa-Balderas et al., 2018; Massonnet, Morales-Cruz, Minio et al., 2018).

4.3 Lignocellulose degradation by GTD associated fungi

Lignocellulose degradative enzymes, such as cellulases, xylanases, laccases and polygalacturonases, are secreted by GTD associated fungi (Santos, Fragoeiro, Valentim, & Phillips, 2006). Furthermore, some of the latter, such as *F. mediterranea* or *S. hirsutum*, are considered as white-rot as they are able to degrade lignin thanks to specific secreted enzymes. GTD associated fungi thus share wood degradation mechanisms with general WD fungi, and studies on tree wood degradation constitute a great source of information to understand grapevine wood degradation mechanisms. In particular, fungal degradation of lignocellulosic substrates involves a large set of enzymes, such as Carbohydrate Active enzymes (CAZys), indexed in the online database <http://www.cazy.org/> (Lombard, Golaconda Ramulu, Drula, Coutinho, & Henrissat, 2014). CAZys include glycoside hydrolases and carbohydrate esterases, known for their role in cellulose, hemicelluloses and pectin degradation, the more recently discovered Lytic Polysaccharide Mono-Oxygenases (LPMO) as well as lignin-degrading auxiliary enzymes (Floudas et al., 2012; Riley et al., 2014; Sigoillot et al., 2012). The molecular mechanisms of glycosyl hydrolases (Coines, Raich, & Rovira, 2019), carbohydrate esterases (Sista Kameshwar & Qin, 2018), ligninolytic enzymes (Wong, 2009), and LPMO (Forsberg, 2019) have been well reviewed. Enzymatic cooperative activities might also be involved in lignocellulose degradation mechanisms (Sigoillot et al., 2012). Enzymatic ligninolytic activities are also acting in synergy with non-enzymatic chemistry (Arantes & Goodell, 2014; Reading, Welch, & Aust, 2003). Non-enzymatic chemistry

involves Fenton chemistry, *i.e.*, redox reactions with free radicals and iron ions, and does not degrade but partially alters lignin. It is particularly relevant for brown-rot fungi, to the detriment of the white-rot, which conserved energetically expensive ligninolytic enzymatic system (Arantes & Goodell, 2014; Arantes, Jellison, & Goodell, 2012; Zhang et al., 2016; Zhang, Silverstein, Castaño, Figueroa, & Schilling, 2019).

Secreted fungal enzymes are able to degrade host-specific lignin. For example, lignin peroxidases are more efficient to degrade G-S units of lignin, more represented in hardwoods, whereas manganese peroxidases are more efficient to degrade G units of lignin, more represented in softwood. Indeed, lignin peroxidases interact with their substrate directly, whereas manganese peroxidases act through Mn^{3+} ions as mediators. The latter, thanks to their ability to be chelated or not, are able to diffuse through plant cell wall, particularly through softwood characteristic G-units of lignin, which form denser structure than G-S units (MacDonald et al., 2011). Of note, secretomes of Basidiomycota are correlated with fungus lifestyle. Indeed, secretomes from selected Basidiomycota, including white-rot, brown-rot, symbiotic and pathogenic species, show specificities. Among them, white-rot species mainly secrete cellulases and lignin oxidases, whereas symbionts and parasites mainly secrete small secreted proteins (Alfaro et al., 2014).

Other secreted enzymes such as amylases, lipases, proteases, and ureases, are also involved in GTD fungal wood colonization. Specificities among GTD fungal species may also be highlighted by extracellular wood degradation enzymes. For example, chitinases, manganese peroxidases and lignin peroxidases were identified in *Phaeoacremonium* sp. and not in *Phaeomoniella* sp. (Del Rio et al., 2004). Furthermore, fungal virulence is correlated with genes encoding for proteins involved in wood degradation (*e.g.*, CAZys and peroxidases) for GTD associated fungi (Morales-Cruz et al., 2015).

4.4 Detoxification mechanisms of GTD associated fungi

4.4.1 Extracellular detoxification mechanisms

In WD, secreted enzymes, such as laccases and dye-decolorizing heme peroxidases, degrade wood toxic extractives (Valette et al., 2017). General WD fungal mechanisms to deal with plant aromatic compounds have been well described (Mäkelä et al., 2015). These mechanisms may be fungal species or host specific. This is particularly illustrated by white spruce degradation by *Phanerochaete carmosa*: kaempferol 3-O- β -D-glucoside (astragaline) and 4',5,7-trihydroxyflavanone-7-rhamnoglucoside (naringin), two spruce wood extractives, are hydrolyzed into a phenolic and a sugar moiety by

P. carnosus, while it is not the case for *P. chrysosporium*. Furthermore, *P. carnosus* colonization induced a higher decrease of total phenolics in softwood (e.g., red spruce, white spruce, and balsam fir) than in hardwoods, suggesting a host specific adaptation (Suzuki et al., 2012).

In the case of GTD-associated fungi, laccases are involved in extracellular detoxification systems by degrading grapevine extractives, such as resveratrol (Santos et al., 2006). Laccases are secreted by *Phaeoacremonium* sp., *Botryosphaeriaceae* sp., and *F. mediterranea*, (Esteves, Saraiva, Correia, & Alves, 2014; Morgenstern, Robertson, & Hibbett, 2010; Reid, 1995). Furthermore, the detoxification activity of *P. chlamydospora*, *P. minimum* and *F. mediterranea* is illustrated by the decrease of plant defense secondary metabolites in xylem and leaves of infected vines showing wood necrosis (Bruno & Sparapano, 2006b).

4.4.2 Intracellular detoxification mechanisms

The efficiency of fungal infection is dependent on the ability of fungi to resist stress and defense molecules from the plant. The intracellular enzymes GST and cytP450 are part of the intracellular detoxification system, so-called xenome (Morel et al., 2013). More than 6000 genes corresponding to 276 families of cytP450 have been identified so far in fungi, and only a few are functionally characterized (for cytP450 sequences and functional characterization databases see <http://drnelson.uthsc.edu/fungal.genomes.html> (Nelson, 2009) and the Fungal Cytochrome cytP450 Database (FCPD) http://p450.riceblast.snu.ac.kr/char_p450.php (Park et al., 2008)). Three cytP450 classes are represented in fungi: (i) class II, endoplasmic reticulum membrane proteins involved in primary and secondary metabolism, and in xenobiotic detoxification or degradation, (ii) class VIII, linked to endoplasmic reticulum membrane or intracellular, involved in fatty acids hydroxylation, and (iii) class IX, involved in denitrification process and detected in cytosol and mitochondrial stroma. The cytP450 family is known as a target of human or plant anti-fungal and pesticide solutions (Jawallapersand et al., 2014). They are namely the target of azoles, e.g., ketoconazole and fluconazole, inhibiting the cytP450 CYP51 in *Saccharomyces cerevisiae* (Črešnar & Petrič, 2011). The enzyme family is involved in primary and secondary metabolism such as ergosterol or aflatoxin biosynthesis, as well as in fungal detoxification system. For example, some cytP450 are able to act against benzoate, a common anti-fungal plant secondary metabolite. CytP450 genes are often associated in cluster with polyketides genes and involved in modification of the polyketide backbone, thus also playing a role in fungal pathogenesis (Gaffoor & Trail, 2006).

The GST family, also involved in the fungal detoxification system, plays an important role in stress response of living organisms, through redox homeostasis regulation, xenobiotics detoxification, or stress signaling (Couto, Wood, & Barber, 2016). This enzyme family is also relevant as specific indicators of stress responses, and as targets of new antioxidant or antimicrobial wood components, due to their capacity to bind specific ligands (Perrot et al., 2020). GST encoding genes are particularly abundant in genomes of WD fungi, and this is partially explained by the extension of three GST classes, the Ure2p, the GST Omega and the fungal specific GST class A. GST are not all functionally characterized, but their main known biochemical activities are deglutathionylation, glutathione transferase, thiol transferase, peroxidase, esterase and ligandin activities (Deroy et al., 2015). Fungal GST belong to at least 9 classes (Morel et al., 2013). Some of them, such as the MAK16 and EF1B γ classes, are classified as GST because of structural similarities, however, they are functionally divergent and their glutathione-related detoxification activity is not clearly demonstrated. Six Omega GST of *T. versicolor*, and five Ure2p of *P. chrysosporium*, the most represented classes in each species, are likely involved in fungal detoxification of hardwood extractives, as suggested by their demonstrated physical interactions with gallic acid, flavonoids, epicatechin and quercetin (Deroy et al., 2015). GST might act in close relationship with cytP450, despite no link between specific classes of cytP450 and GST has been observed yet. The understanding of the exact role of each GST class for fungal adaptation is still under investigations (Bchini, Girardet, Sormani, Gelhaye, & Morel-Rouhier, 2020; Morel et al., 2013; Perrot et al., 2021; Schwartz et al., 2018).

The role of other protein families in fungal host adaptation on wood was suggested by the Comparative Phylogenomic Analysis of trait Evolution (COMPARE) method. This model combines phylogenetic classification with whole-genome sequence data, and underlined specific protein families clusters when applied to 15 white-rot and brown-rot fungal species (Nagy et al., 2014). For example, the major facilitator superfamily MFS-1, reported with no identified domain in the protein families database Pfam (<https://pfam.xfam.org>) was reported as specific to white-rot (Nagy, Riley, et al., 2017; Nagy, Tóth, et al., 2017).

To date, eight genomes of GTD-associated fungi are sequenced: *N. parvum* (Blanco-Ulate, Rolshausen, & Cantu, 2013a), *Togninia minima* (= *P. minimum*) (Blanco-Ulate, Rolshausen, & Cantu, 2013b), *E. lata* (Blanco-Ulate, Rolshausen, & Cantu, 2013c), *F. mediterranea*, *S. hirsutum* (Floudas et al., 2012), *Diaporthe ampelina*, *D. seriata* and *P. chlamydsopora*

(Morales-Cruz et al., 2015). The cytP450 genes families of the main GTD-associated fungi, *F. mediterranea*, *N. parvum*, *D. ampelina*, *E. lata*, *P. chlamydospora* and *P. minimum* are of particular interest because of the general role of cytP450 in detoxification pathways. The cytP450 families CYP65s, CYP531s and CYP58s are particularly abundant in the genomes of the Ascomycota and absent in the Basidiomycota ones, contrary to the CYP5150s, CYP5139s and CYP533s. This set of enzymes participates in biosynthetic pathways of secreted metabolites, including toxins (Morales-Cruz et al., 2015). In *Fusarium* sp. for instance, CYP65s are involved in the biosynthesis of the mycotoxin trichothecene (Črešnar & Petrič, 2011). Moreover, *E. lata* and *D. ampelina* show similar wood symptoms (sectorial necrosis) and both display CYP54 and CYP531 genes (Morales-Cruz et al., 2015). Finally, respectively two and six CYP53 subfamilies were identified in Ascomycota and Basidiomycota WD species. Different evolutionary events may contribute to explain these genomic differences, and consequently differences in detoxification ability between fungal species (Jawallapersand et al., 2014).



5. Conclusion

Forest and grapevine woods are both structurally constituted by cellulose, hemicelluloses and lignin. Cellulose and hemicelluloses constitute an important source of carbon for WD fungi, whereas lignin is a more recalcitrant compound, totally degradable only by white-rot fungi. Also, wood contains or produces secondary metabolites, called extractives, with often antimicrobial or antifungal properties, constituting an important defense barrier against WD. However, differences in wood structure and composition can help to understand the functional traits that allow fungi to colonize specific woods.

Firstly, a higher number of vessels or larger vessel diameters lead to a higher number of fungal pathogens and to a higher sensitivity to fungal colonization, respectively. A higher proportion in G units of the lignin, as in softwoods, as well as a higher wood density, were associated to a better resistance to WD. Secondly, chemical differences can influence fungal adaptation to specific wood. Namely, a higher nitrogen content, as observed in grapevine wood, can lead to different fungal behaviors. Indeed, fungal species-specific nitrogen concentration optimum for carbon intake is reported. Grapevine wood also produces specific extractives such as ϵ -viniferin, resveratrol, α -viniferin, and other stilbenes and polyphenolic components, known

for their antimicrobial and antifungal activities. Furthermore, WD detoxification systems, involving extracellular mechanisms such as laccases and peroxidases activities, and intracellular mechanisms, such as cytP450 and GST activities, are specific to fungal species and to their host. Non-enzymatic secreted proteins or metabolites, particularly relevant for pathogens, which may act in interaction with enzymatic activities as well, probably play a role in fungal host adaptation. Further physiological, proteomic and metabolomic studies on grapevine wood and GTD associated fungi, compared to tree wood and typical tree wood fungal species, could help to better understand fungal adaptation mechanisms. In particular, this could highlight specificities of wood pathogenic fungal agents, and thus contribute to develop strategies for targeted biocontrol solutions.

References

- Abou-Mansour, E., Débieux, J.-L., Ramírez-Suero, M., Bénard-Gellon, M., Magnin-Robert, M., Spagnolo, A., et al. (2015). Phytotoxic metabolites from *Neofusicoccum parvum*, a pathogen of *Botryosphaeria dieback* of grapevine. *Phytochemistry*, *115*, 207–215.
- Agrelli, D., Amalfitano, C., Conte, P., & Mugnai, L. (2009). Chemical and spectroscopic characteristics of the wood of *Vitis vinifera* cv. Sangiovese affected by esca disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 11469–11475.
- Alfaro, M., Oguiza, J. A., Ramírez, L., & Pisabarro, A. G. (2014). Comparative analysis of secretomes in basidiomycete fungi. *Journal of Proteomics*, *102*, 28–43.
- Allison, S. D., LeBauer, D. S., Ofrecio, M. R., Reyes, R., Ta, A.-M., & Tran, T. M. (2009). Low levels of nitrogen addition stimulate decomposition by boreal forest fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, *41*, 293–302.
- Aloni, R., Raviv, A., & Peterson, C. A. (1991). The role of auxin in the removal of dormancy callose and resumption of phloem activity in *Vitis vinifera*. *Canadian Journal of Botany*, *69*, 1825–1832.
- Alves, A., Linaldeddu, B. T., Deidda, A., Scanu, B., & Phillips, A. J. L. (2014). The complex of *Diplodia* species associated with *Fraxinus* and some other woody hosts in Italy and Portugal. *Fungal Diversity*, *67*, 143–156.
- Amalfitano, C., Agrelli, D., Arrigo, A., Mugnai, L., Surico, G., & Evidente, A. (2011). Stilbene polyphenols in the brown red wood of *Vitis vinifera* cv. Sangiovese affected by “esca proper”. *Phytopathologia Mediterranea*, *50*(Suppl.), S224–S235.
- Andolfi, A., Mugnai, L., Luque, J., Surico, G., Cimmino, A., & Evidente, A. (2011). Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. *Toxins*, *3*, 1569–1605.
- Arantes, V., & Goodell, B. (2014). Current understanding of brown-rot fungal biodegradation mechanisms: A review. In T. P. Schultz, B. Goodell, & D. D. Nicholas (Eds.), *Deterioration and protection of sustainable biomaterials* (pp. 3–21). Washington, DC: American Chemical Society.
- Arantes, V., Jellison, J., & Goodell, B. (2012). Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *94*, 323–338.
- Armengol, J., Gramaje, D., Pérez-Sierra, A., Landeras, E., Alzugaray, R., Luque, J., et al. (2008). First report of canker disease caused by *Neofusicoccum australe* on eucalyptus and pistachio in Spain. *Plant Disease*, *92*(6), 980–980.

- Arzanlou, M., Narmani, A., Khodaei, S., & Moshari, S. (2014). Pome and stone fruit trees as possible reservoir hosts for *Phaeoacremonium* spp., the causal agents of grapevine esca disease, in Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *47*, 717–727.
- Bagniewska-Zadworna, A., Barakat, A., Łakomy, P., Smoliński, D. J., & Zadworna, M. (2014). Lignin and lignans in plant defence: Insight from expression profiling of cinnamyl alcohol dehydrogenase genes during development and following fungal infection in *Populus*. *Plant Science*, *229*, 111–121.
- Bchini, R., Girardet, J., Sormani, R., Gelhaye, E., & Morel-Rouhier, M. (2020). Oxidized glutathione promotes association between eukaryotic translation elongation factor 1Bγ and Ure2p glutathione transferase from *Phanerochaete chrysosporium*. *The FEBS Journal*, *288*, 2956–2969.
- Bénard-Gellon, M., Farine, S., Goddard, M. L., Schmitt, M., Stempien, E., Pensec, F., et al. (2015). Toxicity of extracellular proteins from *Diplodia seriata* and *Neofusicoccum parvum* involved in grapevine Botryosphaeria dieback. *Protoplasma*, *252*, 679–687.
- Berraf, A., & Péros, J.-P. (2005). Importance of eutypa dieback and esca in Algeria and structure of the associated fungal community. *OENO One*, *39*, 121.
- Bettenfeld, P., Fontaine, F., Trouvelot, S., Fernandez, O., & Courty, P.-E. (2020). Woody plant declines. What's wrong with the microbiome? *Trends in Plant Science*, *25*, 381–394.
- Blanco-Ulate, B., Rolshausen, P., & Cantu, D. (2013a). Draft genome sequence of *Neofusicoccum parvum* isolate UCR-NP2, a fungal vascular pathogen associated with grapevine cankers. *Genome Announcements*, *1*, e00339–13. 1/3/e00339–13.
- Blanco-Ulate, B., Rolshausen, P., & Cantu, D. (2013b). Draft genome sequence of the ascomycete *Phaeoacremonium aleophilum* strain UCR-PA7, a causal agent of the esca disease complex in grapevines. *Genome Announcements*, *1*, e00390–13. 1/3/e00390–13.
- Blanco-Ulate, B., Rolshausen, P. E., & Cantu, D. (2013c). Draft genome sequence of the grapevine dieback fungus *Eutypa lata* UCR-EL1. *Genome Announcements*, *1*, e00228–13. 1/3/e00228–13.
- Braun, P., & Schmid, J. (1999). Sap flow measurements in grapevines (*Vitis vinifera* L.) 1. Stem morphology and use of the heat balance method. *Plant and Soil*, *215*, 39–45.
- Broda, M. (2020). Natural compounds for wood protection against fungi—A review. *Molecules*, *25*, 3538.
- Brown, A. A., Lawrence, D. P., & Baumgartner, K. (2020). Role of basidiomycete fungi in the grapevine trunk disease esca. *Plant Pathology*, *69*, 205–220.
- Bruez, E., Vallance, J., Gautier, A., Laval, V., Compant, S., Maurer, W., et al. (2020). Major changes in grapevine wood microbiota are associated with the onset of esca, a devastating trunk disease. *Environmental Microbiology*, *22*, 5189–5206.
- Bruez, E., Vallance, J., Gerbore, J., Lecomte, P., Da Costa, J.-P., Guerin-Dubrana, L., et al. (2014). Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of esca leaf-symptomatic and asymptomatic vines. *PLoS One*, *9*, e95928.
- Bruno, G., & Sparapano, L. (2006a). 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*, *69*, 209–223.
- Bruno, G., & Sparapano, L. (2006b). 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*, *69*, 195–208.
- Burruano, S., Giambra, S., Mondello, V., Dellagrecia, M., Basso, S., Tuzi, A., et al. (2016). Naphthalenone polyketides produced by *Neofusicoccum parvum*, a fungus associated with grapevine Botryosphaeria dieback. *Phytopathologia Mediterranea*, *55*, 197–206.
- Calzarano, F., Amalfitano, C., Seghetti, L., & Cozzolino, V. (2009). Nutritional status of vines affected with esca proper. *Phytopathologia Mediterranea*, *48*, 20–31.
- Carlucci, A., Raimondo, M. L., Cibelli, F., Phillips, A. J. L., & Lops, F. (2013). *Pleurostomophora richardsiae*, *Neofusicoccum parvum* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with a decline of olives in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, *52*, 517–527.

- Carter, M. V. (1991). *The status of Eutypa lata as a pathogen*. CABI Publishing.
- Casieri, L., Hofstetter, V., Viret, O., & Gindro, K. (2009). Fungal communities living in the wood of different cultivars of young *Vitis vinifera* plants. *Phytopathologia Mediterranea*, 48, 73–83.
- Celette, F., Findeling, A., & Gary, C. (2009). Competition for nitrogen in an unfertilized intercropping system: The case of an association of grapevine and grass cover in a Mediterranean climate. *European Journal of Agronomy*, 30, 41–51.
- Chen, H. (2014). Chemical composition and structure of natural lignocellulose. In H. Chen (Ed.), *Biotechnology of lignocellulose* (pp. 25–71). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Claverie, M., Notaro, M., Fontaine, F., & Wery, J. (2020). Current knowledge on grapevine trunk diseases with complex etiology: A systemic approach. *Phytopathologia Mediterranea*, 59, 29–53.
- Coines, J., Raich, L., & Rovira, C. (2019). Modeling catalytic reaction mechanisms in glycoside hydrolases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 53, 183–191.
- Collemare, J., O'Connell, R., & Lebrun, M. (2019). Nonproteinaceous effectors: The *terra incognita* of plant–fungal interactions. *New Phytologist*, 223, 590–596.
- Couto, N., Wood, J., & Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine*, 95, 27–42.
- Črešnar, B., & Petrič, Š. (2011). Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Proteins and Proteomics*, 1814, 29–35.
- De Micco, V., Balzano, A., Wheeler, E. A., & Baas, P. (2016). Tyloses and gums: A review of structure, function and occurrence of vessel occlusions. *IAWA Journal*, 37, 186–205.
- del Cerro, C., Erickson, E., Dong, T., Wong, A. R., Eder, E. K., Purvine, S. O., et al. (2021). Intracellular pathways for lignin catabolism in white-rot fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118, e2017381118.
- Del Frari, G., Gobbi, A., Aggerbeck, M. R., Oliveira, H., Hansen, L. H., & Ferreira, R. B. (2019). Fungicides and the grapevine wood mycobiome: A case study on tracheomycotic ascomycete *Phaeoconiella chlamydospora* reveals potential for two novel control strategies. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1405.
- Del Rio, J. A., Gomez, P., Baidez, A., Fuster, M. D., Ortuno, A., & Frias, V. (2004). phenolic compounds have a role in the defence mechanism protecting grapevine against the fungi involved in Petri disease. *Phytopathologia Mediterranea*, 43, 87–94.
- Del Rio, J. A., Gonzalez, A., Fuster, M. D., Botia, J. M., Gomez, P., Frias, V., et al. (2001). Tylose formation and changes in phenolic compounds of grape roots infected with *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* species. *Phytopathologia Mediterranea*, 40, s394–s399.
- Deroy, A., Saiaq, F., Kebbi-Benkeder, Z., Touahri, N., Hecker, A., Morel-Rouhier, M., et al. (2015). The GSTome reflects the chemical environment of white-rot fungi. *PLoS One*, 10, e0137083.
- Deswarte, C., Canut, H., Kläbe, A., Roustan, J.-P., & Fallot, J. (1996). Transport, cytoplasmic accumulation and mechanism of action of the toxin eutypine in *Vitis vinifera* cells. *Journal of Plant Physiology*, 149, 336–342.
- Djoukeng, J. D., Polli, S., Larignon, P., & Abou-Mansour, E. (2009). Identification of phytotoxins from *Botryosphaeria obtusa*, a pathogen of black dead arm disease of grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 124, 303–308.
- Edwards, J., & Pascoe, I. G. (2004). Occurrence of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and esca in Australian grapevines. *Australasian Plant Pathology*, 33, 273.
- Elena, K., Fischer, M., Dimou, D., & Dimou, D. M. (2006). *Fomitiporia mediterranea* infecting citrus trees in Greece. *Phytopathologia Mediterranea*, 45, 5.

- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., & Penninckx, M. (2008). Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *35*, 1531–1538.
- Ellmore, G. S., Zanne, A. E., & Orians, C. M. (2006). Comparative sectoriality in temperate hardwoods: Hydraulics and xylem anatomy. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *150*, 61–71.
- Eriksson, K.-E. L., Blanchette, R. A., & Ander, P. (1990). *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Esteves, A. C., Saraiva, M., Correia, A., & Alves, A. (2014). Botryosphaeriales fungi produce extracellular enzymes with biotechnological potential. *Canadian Journal of Microbiology*, *60*, 332–342.
- Evidente, A., Punzo, B., Andolfi, A., Cimmino, A., Melck, D., & Luque, J. (2010). Lipophilic phytotoxins produced by *Neofusicoccum parvum*, a grapevine canker agent. *Phytopathologia Mediterranea*, *49*, 74–79.
- Feliciano, A. J., Eskalen, A., & Gubler, W. D. (2004). Differential susceptibility of three grapevine cultivars to *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora* in California. *Phytopathologia Mediterranea*, *43*, 66–69.
- Fischer, M. (2002). A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). *Mycological Progress*, *1*, 315–324.
- Fischer, M. (2006). Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine: A worldwide perspective. *Phytopathologia Mediterranea*, *45*, 13.
- Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R. A., Henrissat, B., et al. (2012). The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science*, *336*, 1715–1719.
- 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.
- Forsberg, Z. (2019). Polysaccharide degradation by lytic polysaccharide monoxygenases. *Current Opinion in Structural Biology*, *59*, 54–64.
- Gaffoor, I., & Trail, F. (2006). characterization of two polyketide synthase genes involved in zearalenone biosynthesis in *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*, 1793–1799.
- Gómez, B. L., & Nosanchuk, J. D. (2003). Melanin and fungi. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *16*, 91–96.
- Gong, P., Chong, J., Farine, S., & Bertsch, C. (2019). Characterization of FmMCA gene, a unique metacaspase from grapevine trunk disease phytopathogen *Fomitiporia mediterranea*. In *Abstracts of Oral and Poster Presentations given at the 11th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases. Présenté à Penticton, British Columbia, Canada. Penticton, British Columbia, Canada: Phytopathologia Mediterranea*.
- Gramaje, D., Agustí-Brisach, C., Pérez-Sierra, A., Moralejo, E., Olmo, D., Mostert, L., et al. (2012). Fungal trunk pathogens associated with wood decay of almond trees on Mallorca (Spain). *Persoonia—Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, *28*, 1–13.
- Gramaje, D., Mostert, L., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2015). *Phaeoacremonium*: From esca disease to phaeoohyphomycosis. *Fungal Biology*, *119*, 759–783.
- Guarnaccia, V., Groenewald, J. Z., Woodhall, J., Armengol, J., Cinelli, T., Eichmeier, A., et al. (2018). Diaporthe diversity and pathogenicity revealed from a broad survey of grapevine diseases in Europe. *Persoonia—Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, *40*, 135–153.
- Guettler, S., Jackson, E. N., Lucchese, S. A., Honaas, L., Green, A., Hittinger, C. T., et al. (2003). ESTs from the basidiomycete *Schizophyllum commune* grown on nitrogen-replete and nitrogen-limited media. *Fungal Genetics and Biology*, *39*, 191–198.

- Heath, R. N., Roux, J., Slippers, B., Drenth, A., Pennycook, S. R., Wingfield, B. D., et al. (2011). Occurrence and pathogenicity of *Neofusicoccum parvum* and *N. mangiferae* on ornamental Tibouchina species: *Neofusicoccum* spp. on Tibouchina. *Forest Pathology*, *41*, 48–51.
- Higuchi, T. (2003). Pathways for monolignol biosynthesis via metabolic grids: Coniferyl aldehyde 5-hydroxylase, a possible key enzyme in angiosperm syringyl lignin biosynthesis. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, *79B*, 227–236.
- Howard, R. L., Abotsi, E., van Jansen, R. E. L., & Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: Issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, *2*, 602–619.
- Jang, Y., Jang, S., Lee, J., Lee, H., Lim, Y. W., Kim, C., et al. (2016). Diversity of wood-inhabiting polyporoid and corticioid fungi in Odaesan National Park, Korea. *Mycobiology*, *44*, 217–236.
- Jawallapersand, P., Mashele, S. S., Kovačič, L., Stojan, J., Komel, R., Pakala, S. B., et al. (2014). Cytochrome P450 monooxygenase CYP53 Family in fungi: Comparative structural and evolutionary analysis and its role as a common alternative anti-fungal drug target. *PLoS One*, *9*, e107209.
- Kim, Y. K., Kwak, J. H., Aguilar, C. G., & Xiao, C. L. (2016). First report of black rot on apple fruit caused by *Diplodia seriata* in Washington state. *Plant Disease*, *100*, 1499.
- Laine, C. (2014). Structures of hemicelluloses and pectins in wood and pulp. *KCL Communications*, *10*, 1–64.
- Laurent, B., Marchand, M., Chancerel, E., Saint-Jean, G., Capdevielle, X., Poeydebat, C., et al. (2020). A richer community of *Botryosphaeriaceae* within a less diverse community of fungal endophytes in grapevines than in adjacent forest trees revealed by a mixed metabarcoding strategy. *Phytobiomes Journal*, *4*, 252–267.
- Lehnebach, R., Bossu, J., Va, S., Morel, H., Amusant, N., Nicolini, E., et al. (2019). Wood density variations of legume trees in French Guiana along the shade tolerance continuum: Heartwood effects on radial patterns and gradients. *Forests*, *10*, 80.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, *42*, D490–D495.
- MacDonald, J., Doering, M., Canam, T., Gong, Y., Guttman, D. S., Campbell, M. M., et al. (2011). Transcriptomic responses of the softwood-degrading white-rot fungus *Phanerochaete carmosa* during growth on coniferous and deciduous wood. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*, 3211–3218.
- Magnin-Robert, M., Spagnolo, A., Boulanger, A., Joyeux, C., Clément, 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.
- Magnin-Robert, M., Spagnolo, A., Dilezitoko Alayi, T., Cilindre, C., Mercier, L., Schaeffer-Reiss, C., et al. (2014). Proteomic insights into changes in grapevine wood in response to esca proper and apoplexy. *Phytopathologia Mediterranea*, *53*, 168–187.
- Mahoney, N., Lardner, R., Molyneux, R. J., Scott, E. S., Smith, L. R., & Schoch, T. K. (2003). Phenolic and heterocyclic metabolite profile of the grapevine pathogen *Eutypa lata*. *Phytochemistry*, *64*(2), 475–484.
- Mäkelä, M. R., Marinović, M., Nousiainen, P., Liwanag, A. J. M., Benoit, I., Sipilä, J., et al. (2015). Aromatic metabolism of filamentous fungi in relation to the presence of aromatic compounds in plant biomass. *Advances in Applied Microbiology*, *91*, 63–137.
- Marco, S. D., Calzarano, F., Osti, F., & Mazzullo, A. (2004). Pathogenicity of fungi associated with a decay of kiwifruit. *Australasian Plant Pathology*, *33*, 337.
- Marincowitz, S., Groenewald, J. Z., Wingfield, M. J., & Crous, P. W. (2008). Species of *Botryosphaeriaceae* occurring on Proteaceae. *Persoonia—Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, *21*, 111–118.

- Markakis, E. A., Kavroulakis, N., Ntougias, S., Koubouris, G. C., Sergentani, C. K., & Ligoixigakis, E. K. (2017). Characterization of fungi associated with wood decay of tree species and grapevine in Greece. *Plant Disease*, *101*, 1929–1940.
- Markakis, E. A., Ligoixigakis, E. K., Roussos, P. A., Sergentani, C. K., Kavroulakis, N., Roiditakis, E. N., et al. (2019). Differential susceptibility responses of Greek olive cultivars to *Fomitiporia mediterranea*. *European Journal of Plant Pathology*, *153*, 1055–1066.
- Martinez, D., Larrondo, L. F., Putnam, N., Gelpke, M. D. S., Huang, K., Chapman, J., et al. (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnology*, *22*, 695–700.
- Massonnet, M., Morales-Cruz, A., Figueroa-Balderas, R., Lawrence, D. P., Baumgartner, K., & Cantu, D. (2018). Condition-dependent co-regulation of genomic clusters of virulence factors in the grapevine trunk pathogen *Neofusicoccum parvum*: Pathogenomics of Botryosphaeria dieback. *Molecular Plant Pathology*, *19*, 21–34.
- Massonnet, M., Morales-Cruz, A., Minio, A., Figueroa-Balderas, R., Lawrence, D. P., Travadon, R., et al. (2018). 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*, *9*, 1784.
- Mikiashvili, N., Elisashvili, V., Wasser, S., & Nevo, E. (2005). Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. *Biotechnology Letters*, *27*, 955–959.
- Mohammadi, H., Kazemi, S., & Farahmand, H. (2014). *Phaeoacremonium* and *Botryosphaeriaceae* species associated with cypress (*Cupressus sempervirens* L.) decline in Kerman province (Iran). *Phytopathologia Mediterranea*, *53*, 27–39.
- Molyneux, R. J., Mahoney, N., Bayman, P., Wong, R. Y., Meyer, K., & Irelan, N. (2002). *Eutypa* dieback in grapevines: Differential production of acetylenic phenol metabolites by strains of *Eutypa lata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 1393–1399.
- Morales-Cruz, A., Amrine, K. C. H., Blanco-Ulate, B., Lawrence, D. P., Travadon, R., Rolshausen, P. E., et al. (2015). Distinctive expansion of gene families associated with plant cell wall degradation, secondary metabolism, and nutrient uptake in the genomes of grapevine trunk pathogens. *BMC Genomics*, *16*, 469.
- Morales-Cruz, A., Figueroa-Balderas, R., García, J. F., Tran, E., Rolshausen, P. E., Baumgartner, K., et al. (2018). Profiling grapevine trunk pathogens in planta: A case for community-targeted DNA metabarcoding. *BMC Microbiology*, *18*, 214.
- Morel, M., Meux, E., Mathieu, Y., Thuillier, A., Chibani, K., Harvengt, L., et al. (2013). Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi: Fungal xenomic networks. *Microbial Biotechnology*, *6*, 248–263.
- Morgenstern, I., Robertson, D. L., & Hibbett, D. S. (2010). Characterization of three mnp genes of *Fomitiporia mediterranea* and report of additional class ii peroxidases in the order Hymenochaetales. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*, 6431–6440.
- 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.
- Nagy, L. G., Ohm, R. A., Kovács, G. M., Floudas, D., Riley, R., Gácsér, A., et al. (2014). Latent homology and convergent regulatory evolution underlies the repeated emergence of yeasts. *Nature Communications*, *5*, 4471.
- Nagy, L. G., Riley, R., Bergmann, P. J., Krizsán, K., Martin, F. M., Grigoriev, I. V., et al. (2017). Genetic bases of fungal white rot wood decay predicted by phylogenomic analysis of correlated gene-phenotype evolution. *Molecular Biology and Evolution*, *34*, 35–44.
- Nagy, L. G., Tóth, R., Kiss, E., Slot, J., Gácsér, A., & Kovács, G. M. (2017). Six Key Traits of Fungi: Their evolutionary origins and genetic bases. In J. Heitman, B. J. Howlett, P. W. Crous, E. H. Stukenbrock, T. Y. James, & N. A. R. Gow (Eds.), *The fungal kingdom* (pp. 35–56). Washington, DC: ASM Press.

- Nazar Pour, F., Cobos, R., Rubio Coque, J. J., Serôdio, J., Alves, A., Félix, C., et al. (2020). Toxicity of recombinant necrosis and ethylene-inducing proteins (NLPs) from *Neofusicoccum parvum*. *Toxins*, *12*, 235.
- Nelson, D. R. (2009). The cytochrome P450 homepage. *Human Genomics*, *4*, 59.
- Octave, S., Fleurat-Lessard, P., & Roblin, G. (2009). *Diagnosis of Eutypa lata infection in grapevines by serological detection of secreted polypeptides* (pp. 321–330). Springer. juillet.
- Olson, M. E., & Rosell, J. A. (2013). Vessel diameter-stem diameter scaling across woody angiosperms and the ecological causes of xylem vessel diameter variation. *New Phytologist*, *197*, 1204–1213.
- Park, J., Lee, S., Choi, J., Ahn, K., Park, B., Park, J., et al. (2008). Fungal cytochrome P450 database. *BMC Genomics*, *9*, 402.
- Péros, J.-P., & Berger, G. (2003). Genetic structure and variation in aggressiveness in European and Australian populations of the grapevine dieback fungus *Eutypa lata*. *European Journal of Plant Pathology*, *109*(9), 909–919.
- Péros, J.-P., Berger, G., & Jamaux-Despréaux, I. (2008). Symptoms, wood lesions and fungi associated with esca in organic vineyards in Languedoc-Roussillon (France): Esca in French organic vineyards. *Journal of Phytopathology*, *156*, 297–303.
- Perrot, T., Salzet, G., Amusant, N., Beauchene, J., Gérardin, P., Dumarçai, S., et al. (2020). A reverse chemical ecology approach to explore wood natural durability: Glutathione transferases for wood durability. *Microbial Biotechnology*, *0*, 1–5.
- Perrot, T., Schwartz, M., Dero, A., Girardet, J.-M., Kohler, A., Morel-Rouhier, M., et al. (2021). Diversity of omega glutathione transferases in mushroom-forming fungi revealed by phylogenetic, transcriptomic, biochemical and structural approaches. *Fungal Genetics and Biology*, *148*, 103506.
- Pilotti, M., Gervasi, F., & Brunetti, A. (2005). Molecular identification of *Fomitiporia mediterranea* and *Eutypa lata*/Libertella blepharis in *Platanus x acerifolia*. *Journal of Phytopathology*, *153*, 193–202.
- Pouzoulet, J., Jacques, A., Besson, X., Dayde, J., & Mailhac, N. (2013). Histopathological study of response of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon to bark and wood injury with and without inoculation by *Phaeoconiella chlamydospora*. *Phytopathologia Mediterranea*, *52*, 313–323. JSTOR.
- Pouzoulet, J., Rolshausen, P. E., Charbois, R., Chen, J., Guillaumie, S., Ollat, N., et al. (2020). Behind the curtain of the compartmentalization process: Exploring how xylem vessel diameter impacts vascular pathogen resistance. *Plant, Cell & Environment*, *43*, 2782–2796.
- Pouzoulet, J., Scudiero, E., Schiavon, M., & Rolshausen, P. E. (2017). Xylem vessel diameter affects the compartmentalization of the vascular pathogen *Phaeoconiella chlamydospora* in grapevine. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1442.
- Ramírez-Suero, M., Bénard-Gellon, M., Chong, J., Laloue, H., Stempien, E., Abou-Mansour, E., et al. (2014). Extracellular compounds produced by fungi associated with Botryosphaeria dieback induce differential defence gene expression patterns and necrosis in *Vitis vinifera* cv. Chardonnay cells. *Protoplasma*, *251*, 1417–1426.
- Reading, N. S., Welch, K. D., & Aust, S. D. (2003). Free radical reactions of wood-degrading fungi. In B. Goodell, D. D. Nicholas, & T. P. Schultz (Eds.), *Wood deterioration and preservation* (pp. 16–31). Washington, DC: American Chemical Society.
- Reid, I. D. (1979). The influence of nutrient balance on lignin degradation by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Canadian Journal of Botany*, *57*, 2050–2058.
- Reid, I. D. (1995). Biodegradation of lignin. *Canadian Journal of Botany*, *73*, 1011–1018.
- Riley, R., Salamov, A. A., Brown, D. W., Nagy, L. G., Floudas, D., Held, B. W., et al. (2014). Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*, 9923–9928.

- Rolshausen, P., Wilcox, W., & Baumgartner, K. (2010). Distribution and occurrence of fungi associated with grapevine trunk diseases in northeastern American vineyards. *Phytopathologia Mediterranea*, *49*, 105.
- Rooney-Latham, S., Eskalen, A., & Gubler, W. D. (2005). Occurrence of *Togninia minima* perithecia in esca-affected vineyards in California. *Plant Disease*, *89*, 867–871.
- Rudelle, J., Octave, S., Kaid-Harche, M., Roblin, G., & Fleurat-Lessard, P. (2005). Structural modifications induced by *Eutypa lata* in the xylem of trunk and canes of *Vitis vinifera*. *Functional Plant Biology*, *32*, 537.
- Sahu, N., Merényi, Z., Bálint, B., Kiss, B., Sipos, G., Owens, R. A., et al. (2021). Hallmarks of basidiomycete soft- and white-rot in wood-decay -omics data of two *Armillaria* species. *Microorganisms*, *9*, 149.
- Sakalidis, M. L., Hardy, G. E. S. J., & Burgess, T. I. (2011). Class III endophytes, clandestine movement amongst hosts and habitats and their potential for disease; a focus on *Neofusicoccum australe*. *Australasian Plant Pathology*, *40*, 510–521.
- Santos, R. B., Capanema, E. A., Balakshin, M. Y., Chang, H., & Jameel, H. (2012). Lignin structural variation in hardwood species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 4923–4930.
- Santos, C., Fragoeiro, S., Valentim, H., & Phillips, A. (2006). Phenotypic characterisation of *Phaeoacremonium* and *Phaeoemoniella* strains isolated from grapevines: Enzyme production and virulence of extra-cellular filtrate on grapevine calluses. *Scientia Horticulturae*, *107*, 123–130.
- Schilder, A. M. C., Erincik, O., Castlebury, L., Rossman, A., & Ellis, M. A. (2005). Characterization of *Phomopsis* spp. infecting grapevines in the Great Lakes Region of North America. *Plant Disease*, *89*, 755–762.
- Schwartz, M., Perrot, T., Deroy, A., Roret, T., Morel-Rouhier, M., Mulliert, G., et al. (2018). *Trametes versicolor* glutathione transferase Xi 3, a dual Cys-GST with catalytic specificities of both Xi and Omega classes. *FEBS Letters*, *592*, 3163–3172.
- Schwarze, F. W. M. R. (2007). Wood decay under the microscope. *Fungal Biology Reviews*, *21*, 133–170.
- Schwarze, F. W. M. R., Fink, S., & Deflorio, G. (2003). Resistance of parenchyma cells in wood to degradation by brown rot fungi. *Mycological Progress*, *2*, 267–274.
- Shigo, A. L. (1984). Compartmentalization: A conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. *Annual Review of Phytopathology*, *22*, 189–214.
- Sigoillot, J.-C., Berrin, J.-G., Bey, M., Lesage-Meessen, L., Levasseur, A., Lomascolo, A., et al. (2012). Fungal strategies for lignin degradation. *Advances in Botanical Research*, *61*, 263–308.
- Sista Kameshwar, A. K., & Qin, W. (2018). Understanding the structural and functional properties of carbohydrate esterases with a special focus on hemicellulose deacetylating acetyl xylan esterases. *Mycology*, *9*, 273–295.
- Spagnolo, A., Larignon, P., Magnin-Robert, M., Hovasse, A., Cilindre, C., Van Dorselaer, 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.
- Spagnolo, A., Magnin-Robert, M., Alayi, T. D., Cilindre, C., Mercier, L., Schaeffer-Reiss, C., et al. (2012). Physiological changes in green stems of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay in response to esca proper and apoplexy revealed by proteomic and transcriptomic analyses. *Journal of Proteome Research*, *11*, 461–475.
- Sparapano, L., Bruno, G., & Graniti, A. (2000). Effects on plants of metabolites produced in culture by *Phaeoacremonium chlamydosporum*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. *Phytopathologia Mediterranea*, *39*, 169–177.

- Stempien, E., Goddard, M.-L., Leva, Y., Bénard-Gellon, M., Laloue, H., Farine, S., et al. (2018). Secreted proteins produced by fungi associated with *Botryosphaeria dieback* trigger distinct defense responses in *Vitis vinifera* and *Vitis rupestris* cells. *Protoplasma*, *255*, 613–628.
- Sun, H., Paulin, L., Alatalo, E., & Asiegbu, F. O. (2011). Response of living tissues of *Pinus sylvestris* to the saprotrophic biocontrol fungus *Phlebiopsis gigantea*. *Tree Physiology*, *31*, 438–451.
- Suzuki, H., MacDonald, J., Syed, K., Salamov, A., Hori, C., Aerts, A., et al. (2012). Comparative genomics of the white-rot fungi, *Phanerochaete carmosa* and *P. chrysosporium*, to elucidate the genetic basis of the distinct wood types they colonize. *BMC Genomics*, *13*, 444.
- Tabacchi, R., Fkyerat, A., Poliart, C., & Dubin, G.-M. (2000). Phytotoxins from fungi of esca of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, *39*, 6.
- Tarasov, D., Leitch, M., & Fatehi, P. (2018). Lignin-carbohydrate complexes: Properties, applications, analyses, and methods of extraction: A review. *Biotechnology for Biofuels*, *11*.
- Thomidis, T., Michailides, T. J., & Exadaktylou, E. (2011). *Neofusicoccum parvum* associated with fruit rot and shoot blight of peaches in Greece. *European Journal of Plant Pathology*, *131*, 661–668.
- Torelli, N., Krizaj, B., & Oven, P. (1994). *Barrier zone (CODIT) and wound-associated wood in beech (Fagus sylvatica L.)* (pp. 279–284). *University of Ljubljana*.
- Tsiatsiani, L., Van Breusegem, F., Gallois, P., Zavalov, A., Lam, E., & Bozhkov, P. V. (2011). Metacaspases. *Cell Death and Differentiation*, *18*, 1279–1288.
- Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Guerrero, J. C., Guevara, J., & Gubler, W. D. (2008). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease*, *92*, 519–529.
- Úrbez-Torres, J. R., Peduto, F., Vossen, P. M., Krueger, W. H., & Gubler, W. D. (2013). Olive twig and branch dieback: Etiology, incidence, and distribution in California. *Plant Disease*, *97*, 231–244.
- Valette, N., Perrot, T., Sormani, R., Gelhaye, E., & Morel-Rouhier, M. (2017). Antifungal activities of wood extractives. *Fungal Biology Reviews*, *31*, 113–123.
- Vanden Wymelenberg, A., Gaskell, J., Mozuch, M., Splinter BonDurant, S., Sabat, G., Ralph, J., et al. (2011). Significant alteration of gene expression in wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium* by plant species. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*, 4499–4507.
- Vico, I., Žebeljan, A., Vučković, N., Vasić, M., & Duduk, N. (2017). First report of *Diplodia seriata* causing postharvest rot of quince fruit in Serbia. *Plant Disease*, *101*, 1692–1720.
- Wagschal, I., Abou-Mansour, E., Petit, A.-N., Clement, C., & Fontaine, F. (2008). Wood diseases of grapevine: A review on eutypa dieback and esca. In E. A. Barka, & C. Clément (Eds.), *Plant-microbe interactions*. Trivandrum: Research Signpost (Chapter 16).
- Wong, D. W. S. (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *157*, 174–209.
- Zapata, C., Deléens, E., Chaillou, S., & Magné, C. (2004). Partitioning and mobilization of starch and N reserves in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Plant Physiology*, *161*, 1031–1040.
- Zhang, J., Presley, G. N., Hammel, K. E., Ryu, J.-S., Menke, J. R., Figueroa, M., et al. (2016). Localizing gene regulation reveals a staggered wood decay mechanism for the brown rot fungus *Postia placenta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*, 10968–10973.
- Zhang, J., Silverstein, K. A. T., Castaño, J. D., Figueroa, M., & Schilling, J. S. (2019). Gene regulation shifts shed light on fungal adaption in plant biomass decomposers. *MBio*, *10*, e02176-19.

Transition

Dans ce chapitre d'ouvrage, nous avons vu que les compositions chimique, structurale et anatomique du bois jouent un rôle dans sa durabilité, c'est-à-dire sa capacité à résister à la dégradation microbienne. Inversement, différents mécanismes sont mis en œuvre par les champignons afin de dégrader leur substrat. Des enzymes fongiques sécrétées dans le milieu extracellulaire, formant le secrétome, permettent de dégrader les différents constituants structuraux du bois. Parmi elles, les enzymes impliquées dans la modification des polysaccharides (CAZYmes, pour CarbohydraTE Active enZYmes) permettent de dégrader principalement la cellulose et les hémicelluloses. Des oxydoréductases (peroxydases et laccases principalement) sont quant à elles spécialisées dans la dégradation de la lignine ou des extractibles. Seules les pourritures blanches sont capables de minéraliser totalement la lignine. Elles peuvent adopter un schéma soit de type préférentiel, c'est-à-dire que la lignine sera le composant structural du bois le premier à être dégradé, soit de type simultané, c'est-à-dire que les trois constituants principaux du bois seront dégradés en même temps. Par ailleurs, des enzymes intracellulaires, formant le « xénome », sont impliquées dans la détoxification. Ce processus est utilisé par les champignons pour dégrader ou inactiver des molécules toxiques. En comparaison aux bois de forêt, les spécificités du bois de vigne sont par exemple une faible teneur en lignine (de l'ordre de 12% d'après une étude sur un cultivar), liée à sa nature de liane, une forte teneur en azote (de 2 à 70 fois plus élevée que dans le bois d'arbres forestiers), ou encore la nature de ses extractibles. Ces derniers sont principalement des stilbènes, et sont particulièrement étudiés pour leurs propriétés biologiques, notamment antifongiques. C'est pourquoi cette famille d'extractibles fait l'objet d'une attention particulière dans la suite de cette introduction. Les autres familles d'extractibles retrouvées dans les bois de forêt et de vigne seront également présentés.

2. Les extractibles du bois : diversité, rôle et mécanismes de détoxification

2.1. Définition des extractibles

Le bois est constitué de trois principaux composants structuraux : la cellulose, les hémicelluloses et la lignine, qui forment la paroi cellulaire du bois (Publication n°1 : Schilling et al., 2021). Les extractibles sont l'ensemble des substances organiques non-liées de façon covalente à cette paroi, et peuvent être extraits dans différents solvants (eau, solvants organiques). On les distingue des cendres, également non-liées à la paroi cellulaire mais inorganiques. Les extractibles représentent en général 2 à 10% de la masse sèche du bois, bien

Introduction

que des teneurs plus extrêmes, de 1 à 35%, aient été observées (Rowe, 1989). Il peut s'agir par exemple de glucides, de composés phénoliques (stilbénoides, flavonoïdes, tanins, phénols simples, lignanes, etc.), de terpénoïdes, de lipides, d'amines (dont acides aminés) ou d'éthylène (Fengel and Wegener, 1984). La quantité et la nature des extractibles dans un bois dépendent de plusieurs facteurs, notamment de son génotype, de son âge, du tissu (bois de cœur ou aubier) ou encore de la saison (Roffael, 2016). Dans le bois, ils sont présents dans les canaux résineux et les rayons parenchymateux, mais aussi dans la lamelle moyenne, les espaces intercellulaires, la paroi des trachéides et le lumen (Vahtikari et al., 2017). Certains extractibles dont des composés phénoliques, des terpénoïdes, ou d'autres composés plus rares (*gamma*-et *delta*-lactones, cyanoglycosydes, etc.) possédant des propriétés antimicrobiennes et jouant un rôle dans la durabilité du bois (Scheffer, 1966; Rowe, 1989; Valette et al., 2017; Perrot et al., 2020). Les stilbénoides, principaux extractibles du bois de vigne, puis les autres familles d'extractibles présents dans les bois de forêt ou de vigne sont présentés ci-après.

2.2. Principaux extractibles du bois de vigne : les stilbénoides

2.2.1. Les stilbénoides : définition et voie de biosynthèse

Les stilbénoides sont des polyphénols, c'est-à-dire qu'ils possèdent un ou plusieurs cycle(s) aromatique(s) hydroxylé(s) dans leur structure. Leur voie de biosynthèse est en grande partie commune à de nombreux autres polyphénols, la voie des phénylpropanoïdes, dont la phénylalanine et plus rarement la tyrosine sont les précurseurs (Sharma et al., 2019; Valletta et al., 2021). La phénylalanine et la tyrosine sont elles-mêmes synthétisées par la voie de biosynthèse du shikimate, commune à tous les polyphénols, à partir de phosphoénolpyruvate et d'erythrose-4-phosphate (Figure 2). Au cours de la voie des phénylpropanoïdes, la phénylalanine ammonia lyase (PAL) catalyse la déamination de la phénylalanine en acide cinnamique, lui-même précurseur soit du cinnamoyl coenzyme A (CoA) soit de l'acide *para*-coumarique puis du *para*-coumaroyl coA. Ce dernier est à l'origine de nombreuses familles de polyphénols telles que les flavonoïdes, les coumarines, les anthocyanes, les lignanes et sous-unités de lignine, et une grande partie des stilbénoides (Vogt, 2010).

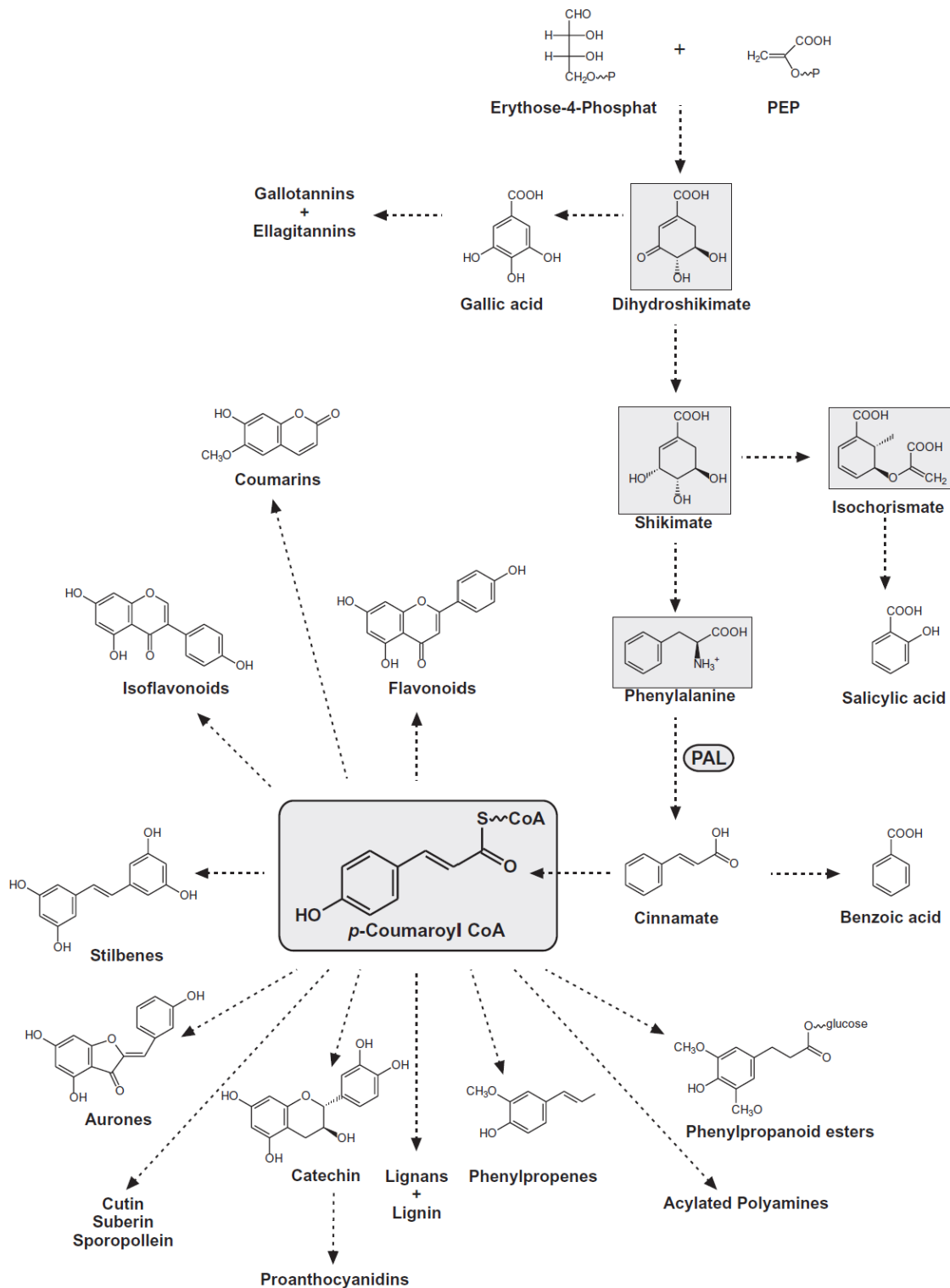


Figure 2 : voies du shikimate et des phénylpropanoïdes : voie de biosynthèse générale des polyphénols (Vogt, 2010). Les métabolites encadrés en gris sont des métabolites centraux de ces voies de biosynthèse. La voie du shikimate condense l'érythrose-4-phosphate et le phosphoenolpyruvate (PEP) en dihydroshikimate, lui-même dihydrogéné en shikimate pour former la phénylalanine ou la tyrosine. La phénylalanine ou la tyrosine sont les précurseurs de la voie des phénylpropanoïdes, à l'origine des stilbénoides (voir Figure 3) et de la diversité des polyphénols. PAL : phénylalanine ammonia lyase.

Certaines plantes possèdent une phénylalanine/tyrosine ammonia lyase (PAL) qui leur permet de synthétiser l'acide *para*-coumarique directement à partir de tyrosine (Valletta et al., 2021). Le cinnamoyl CoA est ensuite transformé en *trans*-pinosylvine (*trans*-3,5-dihydroxystilbène)

Introduction

sous l'action d'une stilbène synthase, la pinosylvine-synthase, tandis que le *para*-coumaroyl coA est transformé en *trans*-resvératrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbène) sous l'action de la resvératrol-synthase. Les deux stilbènes monomériques ainsi synthétisés peuvent ensuite donner lieu à une importante diversité de dérivés, notamment par des glycosylations, méthylations, prénylations, oxydations et oligomérisations (Figure 3).

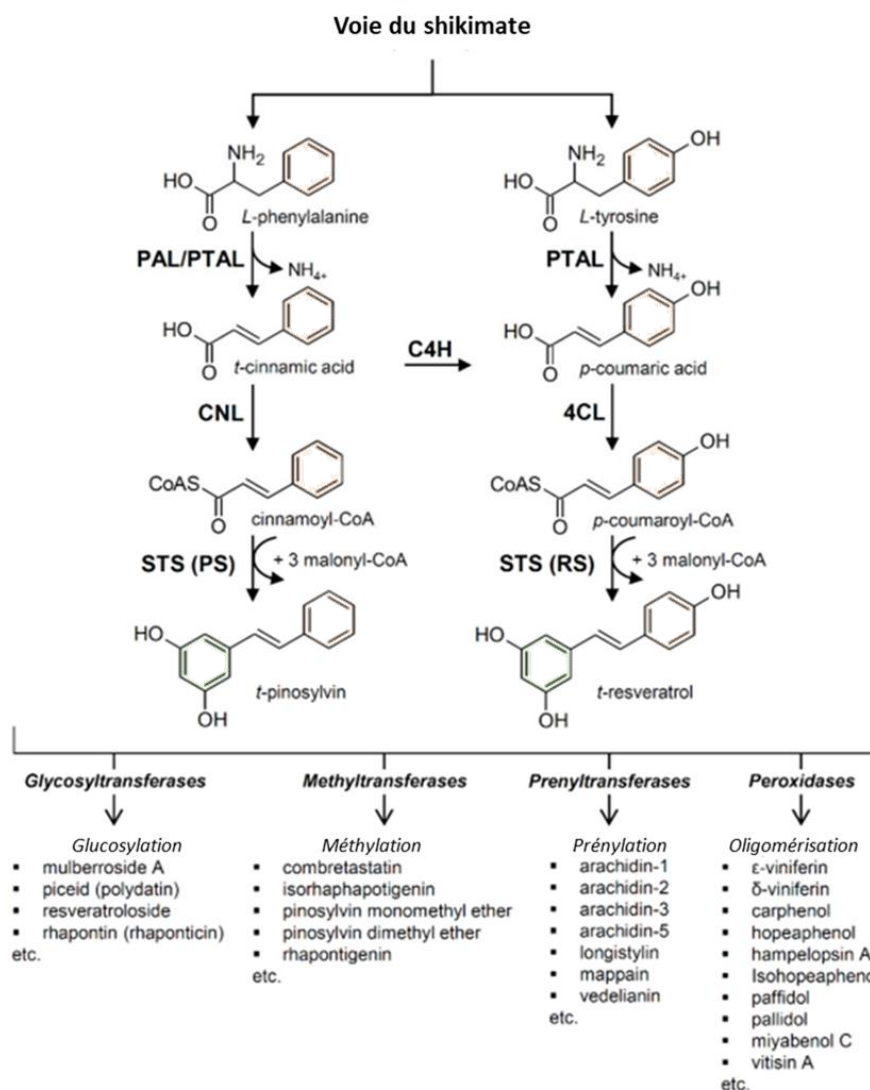


Figure 3: voie de biosynthèse des stilbénoides dans les plantes (adapté de Valletta et al., 2021). PAL : phénylalanine ammonia lyase, PTAL : L-phénylalanine/L-tyrosine ammonia lyase, C4H : cinnamate 4-hydroxylase, 4CL : 4-coumarate coenzymeA ligase, CNL : cinnamate coenzyme A ligase, STS : stilbene synthase, RS : resveratrol synthase, PS : pinosylvine synthase. Les glycosyltransférases, méthyltransférases, prényltransférases et peroxidases sont à l'origine de la grande diversité des stilbénoides.

Les stilbènes au sens strict ont en commun un squelette de base constitué de deux cycles aromatiques reliés par un pont éthylène, c'est-à-dire par deux carbones liés par une double liaison. Deux stéréoisomères, *trans* ou *cis*, peuvent exister en fonction de l'angle induit par ces deux carbones. La forme *trans*- est la plus retrouvée dans la nature, d'autant plus que la forme *cis* parfois observée dans des échantillons naturels pourrait n'être qu'un artefact lié à une isomérisation post-extraction en présence de lumière (Schultz et al., 1992). La forme *trans* a

Introduction

aussi été associée à des propriétés biologiques plus importantes que la forme *cis* (Roupe et al., 2006). Les stilbènes peuvent également subir des modifications (oxydations) entraînant la disparition de la double-liaison au niveau de leur pont éthylène (dihydroresvératrol et dihydropinosylvine par exemple) ou encore une cyclisation entre les noyaux aromatiques (9,10-dihydrophénanthrène par exemple), devenant alors respectivement des bibenzyls (Figure 4a-b) ou des phénantrènes (Figure 4c). Le terme stilbénoides inclut les stilbènes au sens strict, les bibenzyls et les phénantrènes.

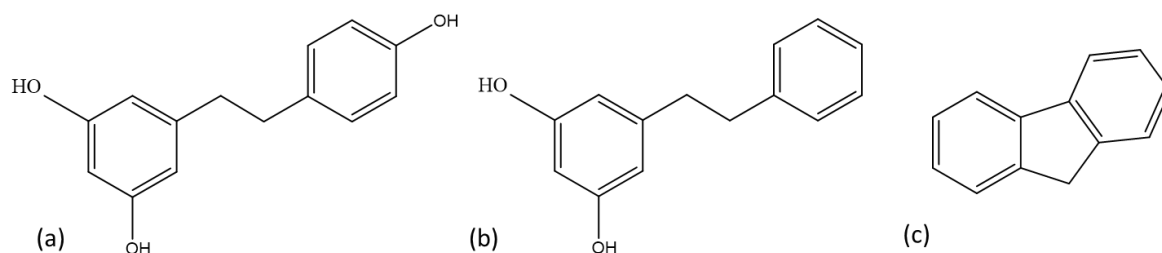


Figure 4: structure chimique de stilbènes monomériques oxydés : (a) dihydroresvératrol, (b) dihydropinosylvine, (c) dihydrophénanthrène.

2.2.2. Répartition des stilbénoides

Les stilbénoides sont répartis dans au moins 49 familles botaniques pour certaines relativement éloignées, dont les *Pinaceae* (en particulier les genres *Picea* et *Pinus*), les *Fabaceae* (dont le genre *Arachis* et au moins 32 autres genres), les *Moraceae* (*Bagassa guianensis*, *Morus* spp., etc.) ou les *Vitaceae* (en particulier le genre *Vitis* mais également d'autres genres tels que *Parthenocissus*, *Cissus* ou *Ampelopsis*) (Rivière et al., 2012). Ils sont présents dans des espèces herbacées ou ligneuses, des mousses (*Corsinia coriandrina* (Spreng) Lindb., *Corsiniaceae* et *Marchesinia bongardiana* Trevis, *Lejeunaceae*) ou des fougères (*Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook., *Ophioglossaceae* et *Dryopteris sublaeta* Ching & Y.P. Hsu, *Dryopteridaceae*), et localisés dans différents organes : racines, rhizomes, bulbes, bois (troncs ou rameaux, écorce, fruits, feuilles, graines ou encore dans des sécrétions de bourgeons ou de feuilles. Dans les forêts à climat continental, les principales espèces dans lesquelles ont été identifiés des stilbénoides font partie de la famille des *Pinaceae* (dans laquelle au moins 15 espèces de *Picea* et au moins 62 espèces de *Pinus* contiennent des stilbénoides) et en moindre proportion celle des *Betulaceae* (*Alnus* sp.). Les stilbénoides identifiés dans les genres *Pinus* (dont *Pinus sylvestris* L., commun sous nos climats) et *Alnus* sont essentiellement la pinosylvine et ses dérivés (éther monométhyle – Figure 5a – dans le cas de *P. sylvestris*, éther diméthyle, etc.), mais également le resvératrol et le pinostilbène (3-méthoxyresvératrol, Figure 5b) notamment dans l'écorce du genre *Pinus*. Le genre *Picea* (en particulier l'espèce *Picea abies* (L.) H. Karst., la plus commune sous nos climats) contient du resvératrol, du picéatannol (3-

Introduction

hydroxyresvératrol, Figure 5c), de l'astringine (picéatannol-3-*O*-glucoside, Figure 5d), de l'isorhapontine (4,5'-dihydroxy-3-methoxy-3'-glucopyranosylstilbène) et de l'isorhapontigénine (3'-methoxy-resvératrol), essentiellement dans l'écorce. La vigne cultivée, *V. vinifera*, fait partie de la famille des *Vitaceae*, qui inclut 16 genres dont au moins huit synthétisent des stilbénoides, tous principalement à partir du resvératrol. Au sein du genre *Vitis*, plusieurs espèces ont été étudiées pour leurs teneurs en stilbénoides notamment du fait de leur intérêt en tant que porte-greffe (*V. berlandieri*, *V. riparia*, *V. rupestris*), en médecine traditionnelle (*V. amurensis*, *V. coignetiae* et *V. thunbergii* en Asie), ou pour la production de jus de raisin (*V. labrusca* cv. Concord aux Etats-Unis). *V. vinifera* est l'espèce la plus importante économiquement et la plus étudiée pour ses teneurs en stilbénoides. Au moins 60 stilbénoides différents y ont été identifiés, principalement le resvératrol et des oligomères de resvératrol, dont l'*epsilon*-viniférine, un dimère de resvératrol présentant un cycle benzofurane (Figure 6a).

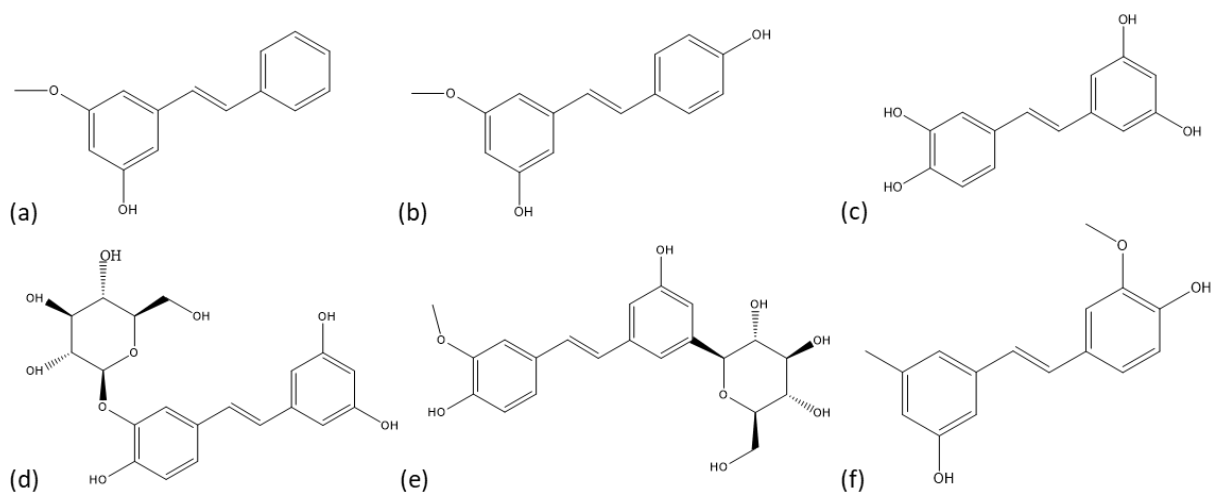


Figure 5: structure chimique de stilbènes présents dans le bois d'arbres forestiers : (a) éther monométhyle de pinosylvine, (b) pinostilbène, (c) picéatannol, (d) astringine, (e) isorhapontine et (f) isorhapontigénine.

2.2.2.1. Nature et teneurs en stilbénoides dans le bois de vigne

Les stilbénoides sont des extractibles également considérés comme des phytoalexines, c'est-à-dire des métabolites spécialisés jouant un rôle dans la défense de la plante et synthétisés ou accumulés en réponse à l'attaque d'un agent pathogène (Jeandet et al., 2002). Les phytoalexines peuvent aussi être présentes de façon constitutive, et voir soit leur concentration augmenter, soit leur structure chimique modifiée suite à un stress, afin d'améliorer la résistance de la plante. C'est le cas de certains stilbénoides présents dans les tissus sains des parties lignifiées de la vigne, et non détectés dans les tissus sains non lignifiés (feuilles, baies) (Bavaresco and Fregoni, 2001). La nature et les teneurs en stilbénoides dans la vigne peuvent être très variables notamment en fonction de l'organe considéré (Németh et al., 2017; Gabaston

et al., 2019), de la saison ou du stade végétatif (Ji et al., 2014; Spagnolo et al., 2014), du génotype (Gatto et al., 2008; Lambert et al., 2013; Duan et al., 2015; Guerrero, 2016; Gabaston et al., 2019), de facteurs environnementaux (Bavaresco et al., 2007; Vergara et al., 2012; Valletta et al., 2021), du mode de conduite (Bavaresco et al., 2003), des méthodes d'extraction et d'analyse (Vergara et al., 2012; Soural et al., 2015), de l'état physiologique de la plante (sain ou ayant subi une attaque d'un agent pathogène ou une blessure, voir partie 2.2.3) ou encore de combinaisons de ces facteurs (année et génotype par exemple) (Guerrero, 2016). Les principaux stilbénoides identifiés dans les organes ligneux sains (d'après une inspection visuelle) de la vigne sont donnés en Annexe 1. Les modifications pouvant être induites par un stress sont détaillées ci-après pour la vigne et pour les bois de forêt contenant des stilbénoides.

2.2.3. Modifications de la composition en stilbénoides du bois

2.2.3.1. Modifications dans le bois de forêt

Les teneurs en stilbénoides dans le bois d'arbres forestiers varient en fonction de leur état physiologique. Par exemple, après inoculation du champignon pathogène *Ophiostoma brunneo-ciliatum* dans le bois de *P. sylvestris*, la zone de réaction contient de la pinosylvine et du pinosylvin-3-*O*-methyl éther ainsi qu'un flavonoïde, la pinocembrine, contrairement aux tissus sains (Lieutier et al., 1996). Ces différences de composition ont été observées après différents types de stress : blessure seule, attaque d'insectes ou traitement à l'ozone, suggérant un rôle non spécifique dans la réponse au stress.

2.2.3.2. Modifications dans le bois de vigne

L'augmentation de la teneur mais aussi des modifications chimiques des stilbénoides en réponse à un stress sont observées dans le bois de vigne. Par exemple, en réponse à l'inoculation du champignon pathogène *N. parvum*, impliqué dans le dépérissement aux *Botryosphaeriaceae*, la teneur en 20 stilbénoides (2 monomères, dont le *trans*-resvératrol, 10 dimères, dont le pallidol et la *trans-delta*-viniférine, sept trimères dont l'*alpha*-viniférine (trimère macrocyclique) et 1 tétramère, l'hopéaphénol, voir Figure 6b-e) augmente 3 jours après inoculation dans du bois issu de rameaux coupés et frais de *V. vinifera* subsp. *vinifera* (Labois et al., 2020). Quelques différences sont observées dans le bois de *V. vinifera* subsp. *sylvestris*, considéré plus résistant aux MDB, dont l'augmentation de la teneur en un autre tétramère, la vitisin C (Figure 6f). La teneur en monomères (*trans*-resvératrol et *trans*-picéatannol) baisse au contraire dans les deux variétés 7 jours après inoculation. Ces

Introduction

observations suggèrent que la formation d'oligomères de stilbènes est une réponse du bois de vigne à une attaque de *N. parvum*. En accord avec cette hypothèse, les teneurs en oligomères (les dimères ampélopsine A (Figure 6g) et *epsilon*-viniférine, le trimère miyabenol C (Figure 7d) et les tétramères hopéaphénol et isohopéaphénol – Figure 7e) sont significativement supérieures dans le bois de boutures de *V. vinifera* 'Merlot' 2 mois après inoculation de *N. parvum*, alors qu'aucune différence de teneurs en monomères, et une tendance à la baisse de la teneur en *trans*-resvératrol, sont observées (Lambert et al., 2012). Au contraire, les teneurs en monomères (resvératrol, picéatannol et resvératrol-4-*O*-glucoside ou picéide), en *epsilon*-viniférine et en astringine dans le bois de *V. vinifera* 'Chardonnay' (cultivar considéré plus résistant), et seulement en resvératrol et en *epsilon*-viniférine dans le bois de *V. vinifera* 'Mourvèdre' (cultivar considéré plus sensible) sont plus importantes dans le bois nécrosé (ponctuations brunes) que dans le bois sain des ceps exprimant des symptômes du BDA (Lemaitre-Guillier et al., 2020). Ces résultats confirment une accumulation de stilbénoides dans le bois de vigne en réponse à la présence de *Botryosphaeriaceae*, mais suggèrent également des spécificités en fonction du cultivar et un effet du temps d'exposition au champignon.

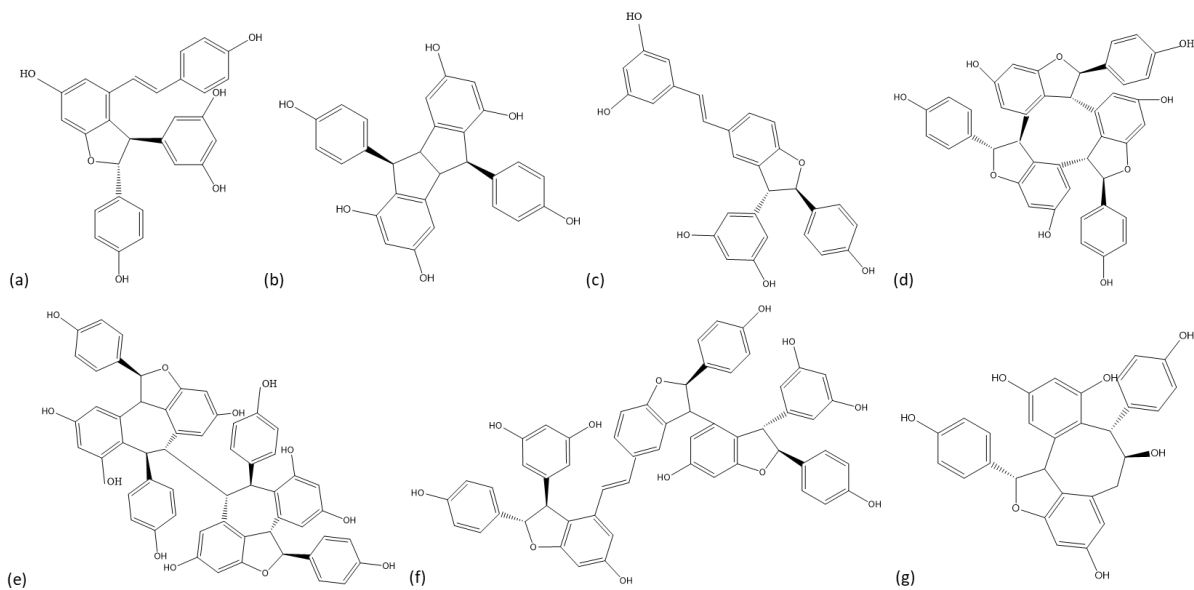


Figure 6: structure chimique d'oligomères de stilbènes : (a) *epsilon*-viniférine, (b) pallidol, (c) *trans*-delta-viniférine, (d) α -viniférine, (e) hopéaphénol. (f) vitisin C, (g) ampélopsine A.

2.2.3.1. Modifications dans le bois de vigne affecté par l'Esca

Afin d'observer plus particulièrement l'impact de l'Esca sur les teneurs en stilbénoides dans le bois de vigne, plusieurs études se sont intéressées à la composition de bois sain ou nécrotique (nécroses brunes ou *amadou*) de ceps affectés ou non par l'Esca. Dans du bois de ceps de *V. vinifera* 'Cabernet Sauvignon' greffés sur *V. berlandieri* x *V. riparia* SO4 et âgés de 12 ans, présentant ou non des symptômes foliaires de l'Esca, des teneurs plus importantes en 5

Introduction

stilbènes (3 glycosides de resvératrol, astringine et un glycoside d'*epsilon*-viniférine) sont observées dans les nécroses que dans le bois sain des ceps symptomatiques et asymptomatiques. Une plus forte teneur en ces composés est également observée dans le bois sain de la tête (partie supérieure du tronc, exposée aux plaies de taille) de ceps symptomatiques que de ceps asymptomatiques, suggérant une réponse également périphérique de la plante (Rusjan et al., 2017). De plus, les teneurs en stilbènes observées dans l'*amadou* des ceps symptomatiques sont inférieures à celles des nécroses brunes, et ce de façon plus marquée dans la tête du bois, suggérant un effet de la localisation dans le cep et à nouveau de la durée d'exposition au champignon.

Plusieurs études montrent également l'augmentation des teneurs en stilbénoides dans le bois suite à l'infection par des champignons associés à l'Esca : les teneurs en au moins 10 stilbénoides dont l'oxyresvératrol, le ptérostilbène (3',5'-dimethoxy-resveratrol), l'*epsilon*-viniférine, l'*alpha*-viniférine et 6 autres stilbénoides annotés putativement d'après leurs données spectrales (le 1-(3,5-Dihydroxyphenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)ethane 4'-O- β -D-glucopyranoside, le leachianol F, l'ampelopsine D, le suffruticosol A, la diptoindonésine B et le *cis*-miyabenol C) augmentent dans le bois de boutures de *V. vinifera* 'Cabernet Sauvignon', suite à l'inoculation de *P. chlamydospora* et *P. minimum* (Chervin et al., 2022). Les teneurs en 9 stilbénoides (le resvératrol, 5 dimères et 3 tétramères) sont plus importantes dans les parties nécrotiques (brunes) d'un cep symptomatique de l'Esca de *V. vinifera* 'Sangiovese' que dans les parties saines de ce même cep (Amalfitano et al., 2011). Dans cette étude le seul trimère de resvératrol identifié, l'*alpha*-viniférine, est présent uniquement dans le bois sain du pied, où il est le composé le plus abondant avec une concentration de 4,7 mg/g sec. Ces observations renforcent l'hypothèse d'une réponse périphérique de la plante. Une étude de l'expression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes dans les parties saines ou nécrotiques de ceps symptomatiques de l'Esca ou asymptomatiques a confirmé que l'accumulation des composés phénoliques est induite par la plante en réponse à un stress tel que la présence des champignons associés à l'Esca (Magnin-Robert et al., 2016).

2.2.4. Propriétés biologiques et rôles des stilbénoides (activités antimicrobiennes et antioxydantes)

2.2.4.1. Activités antifongiques des stilbénoides dérivés du resvératrol

Les stilbénoides jouent un rôle protecteur de la plante, notamment grâce à leurs propriétés antibactériennes, antifongiques et antioxydantes. Des tests d'activités antifongiques du

Introduction

ptérostilbène, du resvératrol, de l'*epsilon*-viniférine et de l'*alpha*-viniférine ont montré des activités inhibitrices sur la germination de spores des phytopathogènes *Cladosporium cucumerinum* (Ascomycota, *Mycosphaerellaceae*), *Botrytis cinerea* (Ascomycota, *Sclerotiniaceae*), *Piricularia oryzae* (Ascomycota, *Magnaporthaceae*), sur la libération et la motilité de zoospores du champignon pathogène de la vigne *Plasmopara viticola* (Oomycota, *Peronosporaceae*), sur la croissance de mycélium de *B. cinerea*, *P. oryzae* et *Pellicularia sasakii* (Basidiomycota, *Ceratobasidiaceae*) et sur la croissance du tube germinatif de *B. cinerea* et *P. oryzae* (Langcake and Pryce, 1977; Langcake, 1981). Chacun de ces tests ont montré une plus forte activité inhibitrice du ptérostilbène (Indice de Concentration permettant d'inhiber 50% de la germination (IC₅₀) entre 2 et 27 µg/mL sur l'ensemble des tests), et l'activité la plus faible pour le resvératrol (IC₅₀ entre 60 et plus de 200 µg/mL sur l'ensemble des test). L'*alpha*-viniférine inhibe la germination des spores (IC₅₀ entre 28 et 97 µg/mL), mais pas la croissance du mycélium. L'*epsilon*-viniférine inhibe la croissance du mycélium (y compris de *P. oryzae*) et la germination des spores de *C. cucumerinum* et *B. cinerea*, mais pas de *P. oryzae*. Ces tests suggèrent donc une activité antifongique non-spécifique pour les monomères et spécifique pour les viniférines. Les activités inhibitrices sur la germination de spores de *B. cinerea* obtenues plus récemment pour l'oxyresvératrol (IC₅₀ 152 µg/mL), le ptérostilbène (IC₅₀ 20,3 µg/mL), l'*epsilon*-viniférine (IC₅₀ 37,5 µg/mL), et l'*alpha*-viniférine (IC₅₀ 92,8 µg/mL) ont confirmé ces observations (Chervin et al., 2022). Les activités inhibitrices de ces stilbènes sont de 3 à 7 fois plus fortes (IC₅₀ respectivement 40,0, 7,3, 8,6 et 13,5 µg/mL) envers la germination de spores de *P. chlamydozoospora* (Chervin et al., 2022).

Les comparaisons des activités antifongiques des stilbénoides selon une même concentration massique ont été discutées du fait de la différence de taille entre les monomères et les oligomères, qui ne permet pas de comparer l'efficacité des molécules entre elles. La comparaison des activités antifongiques *in vitro* à concentrations molaires égales des *trans*-resvératrol, *trans-epsilon*-viniférine, *trans-delta*-viniférine et *trans*-ptérostilbène sur le développement de spores de *B. cinerea* et sur la mobilité de spores de *P. viticola* a confirmé que le *trans*-resvératrol (IC₅₀ resp. de 145,00 et 192,00 µM) possède une activité moins importante que les dimères et que le *trans*-ptérostilbène (Pezet et al., 2004). Ce dernier présente dans ces conditions également la plus forte activité inhibitrice du développement de spores de *B. cinerea* (IC₅₀ 12,70 µM). La *trans-delta*-viniférine (qui n'a pas été comparée dans l'ensemble des tests décrits) montre cependant une plus forte activité sur la mobilité des spores de *P. viticola* (IC₅₀ 14,60 µM). Afin de déterminer le rôle et l'importance de ces différents stilbènes dans les défenses de la plante contre une attaque d'un agent pathogène, ces résultats

Introduction

ont été corrélés à leurs concentrations mesurées dans des feuilles de *V. vinifera* (cv. ‘Chasselas’ et ‘Solaris’) infectées ou non par *P. viticola*. Les concentrations les plus élevées suite à l’infection concernent le *trans*-resvératrol, suivi des deux dimères, et enfin du ptérostilbène, en très faible concentration. Ces observations suggèrent un rôle plus important des dimères en réponse à l’attaque d’un agent pathogène (Pezet et al., 2004).

Plus spécifiquement face aux champignons dégradateurs de bois, l’oxyresvératrol, le resvératrol et le picéatannol inhibent la croissance de la pourriture brune *Gloeophyllum trabeum* (*Basidiomycota*, *Gloeophyllaceae*, IC₅₀ resp. 343, 197 et 196 ppm) et de la pourriture blanche *Trametes versicolor* (*Basidiomycota*, *Polyporaceae*, IC₅₀ resp. 993, 226 et 434ppm) (Schultz et al., 1995). Par ailleurs, l’activité antifongique à 500µM (soit entre 114 et 453µg/mL) de 11 stilbénoides a été testée envers 6 champignons associés aux MDB, dont Fmed et les ascomycètes *D. seriata*, *N. parvum*, *E. lata*, *P. chlamydospora* et *P. minimum* (Lambert et al., 2012). *D. seriata* est le champignon dont la croissance est la plus affectée par les stilbènes. Neuf stilbénoides (le *trans*-picéatannol – IC₅₀ de 299 µM, l’*epsilon*-viniférine – IC₅₀ de 260 µM, l’hopéaphénol, le miyabenol C, les vitisines A et B, l’isohopéaphénol, le *trans*-resvératrol et le *trans*-ptérostilbène – IC₅₀ de 163 µM) inhibent sa croissance. Comme décrit précédemment, l’activité du *trans*-picéatannol est la plus faible parmi les trois molécules, et le *trans*-ptérostilbène a une activité inhibitrice plus forte que l’*epsilon*-viniférine *in vitro*. Les trois champignons associés à l’Esca, *P. chlamydospora*, *P. minimum* et Fmed sont les moins sensibles aux stilbénoides : aucun effet inhibiteur n’a été observé sur la croissance de *P. minimum* (= *P. aleophilum*). Trois stilbénoides (vitisines A et B et le *trans*-ptérostilbène) inhibent la croissance de *P. chlamydospora* et deux de plus (le miyabenol C et l’isohopéaphénol) celle de Fmed (Figure 7a-e). Les activités antifongiques des stilbènes peuvent cependant varier en fonction des souches fongiques. En effet, la croissance mycélienne de la souche *N. parvum* S-116 par exemple est davantage inhibée par la *delta*-viniférine ou le *trans*-resvératrol que la souche *N. parvum* Bt-67 (Stempien et al., 2017). Des spécificités entre les stilbènes et les espèces voire les souches fongiques sont donc observées et peuvent jouer un rôle dans la capacité de ces derniers à se développer sur le bois de vigne.

Introduction

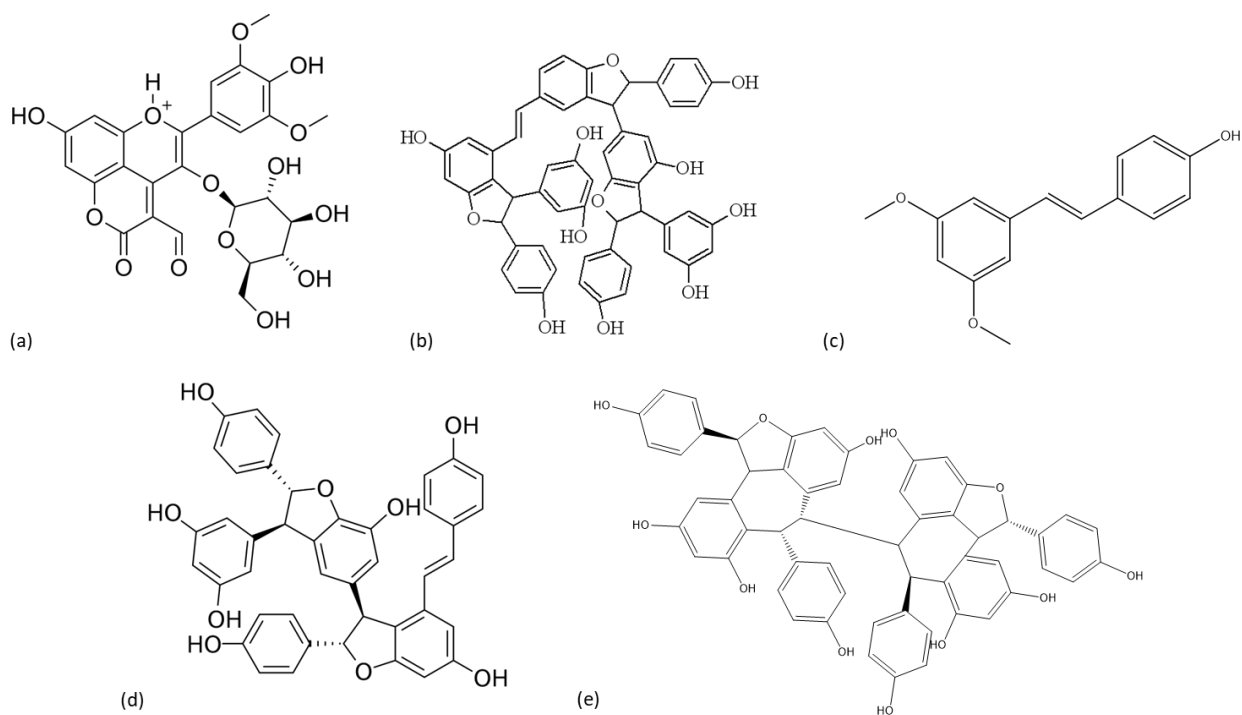


Figure 7: structure chimique des stilbénoides inhibant la croissance de *Fmed* (Lambert et al., 2012) : (a) vitisine A, (b) vitisine B, (c) *trans*-ptérostilbène, (d) miyabenol C et (e) isohopéaphénol.

2.2.4.2. Activités antifongiques des stilbénoides dérivés de la pinosylvine

La croissance de deux champignons dégradateurs de bois de type pourriture brune, *G. trabeum* et *Postia placenta* (*Basidiomycota*, *Dacrybolaceae*), est inhibée par la pinosylvine et par 13 hydroxystilbénoides dérivés de pinosylvine (IC_{50} entre 8 et plus de 90 ppm). Celle du champignon de type pourriture blanche *Coriolus versicolor* (= *T. versicolor*) a été plus faiblement inhibée (IC_{50} entre 78 et plus de 350 ppm) sauf par deux composés (*trans*- et *cis*-3-stilbénols, IC_{50} resp. de 49 et 75 ppm) (Schultz et al., 1992). L'activité des oxydases extracellulaires que possèdent les pourritures blanches a été proposée par les auteurs pour expliquer une détoxification des stilbènes par les pourritures blanches (voir partie 2.2.5). Cette hypothèse n'explique cependant pas la totalité des différences de toxicité observées entre les pourritures brunes et les pourritures blanches (Schultz et al., 1992). Par ailleurs, la pinosylvine a une activité antifongique *in vitro* supérieure lorsqu'elle est extraite que lorsqu'elle est sous forme de poudre de bois. Elle stoppe en effet la croissance de la pourriture brune *Coniophora puteana* (*Basidiomycota*, *Coniophoraceae*), et des pourritures blanches *Peniophora pseudopini* (*Basidiomycota*, *Peniophoraceae*) et *Fomes pini* (*Basidiomycota*, *Hymenochaetaceae*) à des concentrations respectives de 50 et 200 ppm sur malt-agar (2-2%) lorsqu'elle est purifiée, et de 200 et 400 ppm lorsqu'elle est contenue dans la poudre de bois. Ces résultats soulignent que la localisation et l'accessibilité des stilbénoides jouent un rôle important sur leurs propriétés biologiques (Loman, 1970).

2.2.4.3. Activités antioxydantes des stilbénoides

L'attaque d'un agent pathogène peut entraîner plusieurs types de réponses de la plante, spécifiques ou non. De façon non-spécifique, un stress entraîne souvent des réactions d'oxydation qui peuvent elles-mêmes entraîner le dysfonctionnement ou la mort cellulaire. Le caractère antioxydant des stilbénoides peut donc jouer un rôle dans la défense de la plante. Les activités antioxydantes de stilbènes isolés à partir de suspensions cellulaires de *V. vinifera* (*cis*- et *trans*-resvératrol, *cis*- et *trans*-picéide (resvératrol-4-*O*-glucoside), *trans*-picéatannol, *cis*- et *trans*- astringine, et *cis*- et *trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene-3-*O*-glucoside) ont été évaluées en conditions polaires (test au 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl ou DPPH) et apolaires (test d'oxydation des lipoprotéines à faible densités ou LDL) (Waffo Teguo et al., 1998). Dans les deux cas il a été montré que les glycosides de resvératrol ont des activités antioxydantes plus faibles que le resvératrol (IC₅₀ jusqu'à 35 fois supérieur). L'astringine a une activité antioxydante également plus faible que son aglycone le picéatannol (IC₅₀ jusque 1,6 fois supérieur) mais plus importante que le resvératrol (IC₅₀ jusque 6 fois inférieur). D'autres stilbènes (*epsilon*-viniférine, resvératrol, 4-hydroxystilbène, pinosylvine et 2,4-dihydrostilbène, obtenus par synthèse) ont été évaluées en conditions apolaires (tests d'inhibition de l'oxydation de β-carotène en phase lipidique) et dans le DMSO (test au 5,5-diméthyl-1-pyrroline-*N*-oxyde ou DMPO) (Privat et al., 2002). Dans cette étude l'*epsilon*-viniférine a montré un plus fort potentiel antioxydant que le resvératrol. Cependant, le potentiel antioxydant observé *in vitro* peut être amenuisé *in vivo* par une moindre vitesse de diffusion en phase lipide du fait de sa taille (dimère) (Privat et al., 2002). Il a également été montré que la présence d'un groupement phénolique ainsi que la position et le nombre de groupements hydroxyles (OH) joue un rôle important sur les propriétés antioxydantes des stilbènes.

2.2.4.4. Mécanismes antifongiques des stilbénoides

L'activité protectrice du bois des principaux stilbènes de *P. sylvestris* (dont la pinosylvine et son éther méthylique) et des stilbènes en général est probablement due à la combinaison de plusieurs propriétés : leur toxicité, leurs propriétés antioxydantes, et leurs propriétés hydrophobiques (Venäläinen et al., 2004).

L'observation au microscope de conidies de *B. cinerea*, en présence de resvératrol et de ptérostilbène, a montré une transformation structurale et une désorganisation de la cellule, accompagnées parfois de sortie de contenu cytoplasmique hors de la cellule. L'activité respiratoire des conidies est également inhibée (Bavaresco and Fregoni, 2001). Leur toxicité a ainsi été attribuée à leur affinité avec les protéines membranaires, conduisant à la

Introduction

déstructuration de la cellule fongique. Cette toxicité est donc d'autant plus forte dans le cas de stilbènes relativement plus apolaires, c'est-à-dire capables d'accepter un plus grand nombre d'électrons et ainsi de se lier davantage à la membrane lipophile. Cette explication est cohérente avec le fait que le resvératrol, plus polaire que le ptérostilbène (du fait de la double méthylation de ce dernier), soit moins toxique que ce dernier. Par ailleurs, l'observation macroscopique et microscopique de mycélium de *D. seriata* en présence de ptérostilbène suggère une activité plutôt fongistatique que fongitoxique (Lambert et al., 2012).

2.2.4.5. Effet des modifications de la structure chimique des stilbénoides

2.2.4.5.1. Glycosylations des stilbénoides

Les stilbénoides peuvent subir différentes modifications structurales, affectant leurs propriétés chimiques ou biologiques. Parmi elles, la glycosylation, c'est-à-dire la greffe d'un glucide, modifie leur solubilité (en les rendant plus hydrophiles), leur stabilité, leur localisation subcellulaire et leur propriétés biologiques, et diminue généralement leur toxicité (Le Roy et al., 2016; Shimoda et al., 2020). Les champignons, dont les champignons dégradeurs de bois, possèdent des glycosyltransférases capables de réaliser une glycosylation sur les extractibles, préalablement modifiés (généralement oxydés) ou non. Ce processus fait alors partie de la détoxification (Morel et al., 2013).

2.2.4.5.2. Oxydations et oligomérisations des stilbénoides

Les stilbénoides peuvent être oxydés *in vivo* sous l'action d'enzymes, telles que des peroxydases ou des époxydases, puis être oligomérisés (Calderón et al., 1992; Park et al., 2017). Une peroxydase de la vigne par exemple est capable d'oxyder puis d'oligomériser des 4-hydroxystilbènes (dont fait partie le resvératrol) en cas de stress, de façon à former des viniférines aux propriétés antifongiques supérieures (Calderón et al., 1992).

2.2.4.5.1. Substitutions isoprénoides des stilbénoides

Les stilbénoides peuvent être modifiés par l'ajout d'un groupement isoprénolide, c'est-à-dire d'un dérivé de l'isoprène (2-méthylbuta-1,3-diène). Cette modification a été associée à de plus fortes propriétés antifongiques, attribuées à une plus forte hydrophobicité (Aguamah et al., 1981). En effet, une plus forte hydrophobicité et donc une meilleure affinité avec les membranes cellulaires faciliterait la déstructuration des membranes fongiques. Cependant, ce lien entre la structure chimique et les propriétés antifongiques est également dépendant de

Introduction

l'espèce fongique cible. Par exemple, la substitution d'une chaîne isoprénoïde à 10 atomes de carbones sur l'oxyresvératrol (formant la chlorophorine ou 5-[(E)-2-(2,4-dihydroxyphenyl)ethenyl]-2-[(2E)-3,7-dimethylocta-2,6-dienyl]benzene-1,3-diol) est associée à une activité antifongique supérieure à ce dernier envers la pourriture brune *G. trabeum* (IC₅₀ resp. pour la chlorophine et l'oxyresvératrol de 45 et 343 ppm) et envers *T. versicolor* (IC₅₀ resp. 511 et 993 ppm) (Schultz et al., 1995). D'autres stilbènes prénylés parmi les plus étudiés sont retrouvés dans l'arachide *Arachis hypogea*, et certains d'entre eux ont également une activité antifongique supérieure au resvératrol à toutes les concentrations testées (0.3, 3.0 et 30.0 µM) sur la croissance des agents pathogènes de la vigne *Phomopsis viticola* (*Ascomycota, Diaporthaceae*) et de *B. cinerea* (Sobolev et al., 2011).

2.2.5. Activité microbienne : détoxification des stilbéoïdes

2.2.5.1. Mécanismes de détoxification microbienne des stilbéoïdes

La détoxification est définie comme le processus mis en place par un organisme afin d'inactiver des substances toxiques d'origine interne ou externe. Le terme de détoxification est parfois employé également, et désigne plus précisément le phénomène par lequel un métabolite perd sa toxicité. Certains micro-organismes sont capables de détoxifier des métabolites aux propriétés antimicrobiennes, tels que les extractibles de bois. Plusieurs mécanismes de détoxification du resvératrol ont été montrés (Mei et al., 2015). Le premier de ces mécanismes a été montré pour le champignon endophyte de l'arachide *Phomopsis liquidambari* (*Ascomycota, Diaporthaceae*), capable de dégrader *in vitro* le resvératrol en quatre produits de dégradation : l'acide 3,5-dihydroxybenzoïque, l'acide 4-hydroxybenzoïque, le 3,5-dihydroxybenzaldehyde et le 4-hydroxybenzaldehyde (Wang et al., 2019). Cette activité de dégradation a été associée à l'activité d'une oxygénase, dont l'expression du gène est induite par l'ajout de resvératrol dans le milieu de culture (Figure 8). Un autre mécanisme, le plus observé, est l'oxydation du groupement hydroxyle du resvératrol par des laccases (Ponzoni et al., 2007), des peroxydases (Wilkins et al., 2010) ou des lipoxygénases (Pinto et al., 2003). Ces oxydations forment des radicaux qui sont ensuite dimérisés. Cette activité est notamment observée pour des laccases de *Trametes pubescens* (Ponzoni et al., 2007) et de *T. versicolor* (Beneventi et al., 2015), pour l'oxygénase Um Rco1 (pour *Ustilago maydis* Resvératrol cleavage oxygenase 1), produite par l'ascomycète pathogène *U. maydis* (Brefort et al., 2011). Des oxydases à polyphénols (laccase-like) de *B. cinerea* ont également cette activité envers le resvératrol et le pterostilbène (Breuil et al., 1999; Cichewicz et al., 2000). Par ailleurs, l'inhibition de laccases produites par *B. cinerea* réduit la virulence de ce dernier (Bar Nun et al., 1988). Le mécanisme décrit pourrait

Introduction

donc jouer un rôle dans la pathogénicité du champignon. Ces mécanismes d'oxydation et de polymérisation sont également observés pour d'autres extractibles sous l'action d'enzymes fongiques telles que des laccases ou des peroxydases au cours du processus de détoxication (Morel et al., 2013). Cependant, leur rôle reste à élucider plus précisément et peut paraître paradoxal. En effet, les oligomères de resvératrol sont généralement associés à une toxicité supérieure *in vitro* que celle de monomères de stilbènes (voir paragraphe 2.2.4.5.2). L'hypothèse la plus probable serait que ces mécanismes modifient la solubilité des stilbénoides afin qu'ils puissent être transportés dans des compartiments cellulaires où ils seraient moins toxiques.

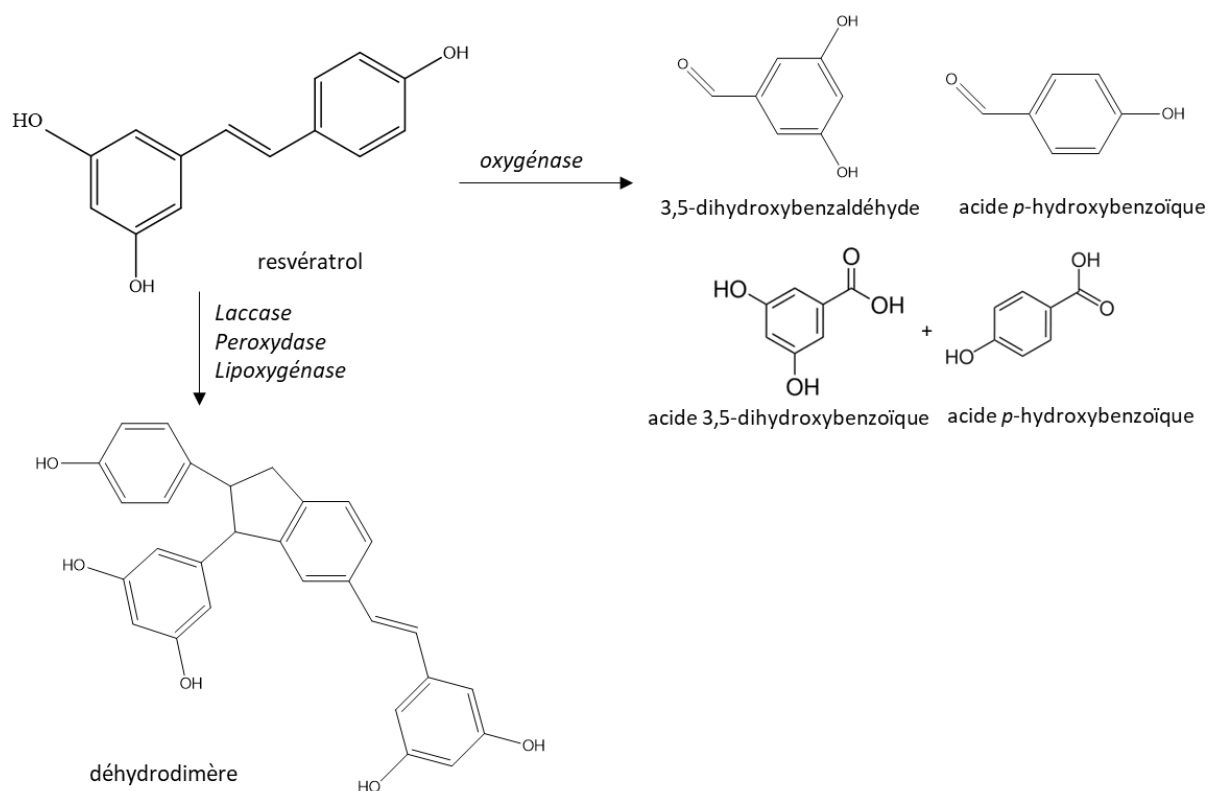


Figure 8: dégradation enzymatique par oxydation et polymérisation du resvératrol par des micro-organismes (adapté de Mei et al., 2015).

2.2.5.2. Détoxication des stilbénoides par les champignons associés aux MDB

La capacité à dégrader ou à métaboliser certains stilbènes a été montrée pour plusieurs espèces de champignons associées aux MDB, dont Fmed et les *Botryosphaeriaceae N. parvum* et *D. seriata* (Bruno and Sparapano, 2006; Stempien et al., 2017). *N. parvum* et *D. seriata* sont capables de dégrader le *trans*-resvératrol et la *delta*-viniférine *in vitro* (Stempien et al., 2017). Fmed est capable de dégrader le resvératrol en deux produits de dégradation non-identifiés (Bruno and Sparapano, 2006). Les mécanismes de détoxication des stilbénoides par les champignons associés aux MDB sont encore peu décrits spécifiquement. Une relativement

Introduction

faible toxicité des stilbénoides de la vigne est observée envers les champignons associés à l'Esca (voir partie 2.2.4.1). Cela suggère soit des mécanismes de toxicité auxquels les champignons sont peu sensibles, encore seulement peu élucidés, soit qu'ils soient particulièrement capables de les détoxifier. Certaines études suggèrent des mécanismes de détoxification similaires à ceux décrits dans le paragraphe précédent par Wang et al. (2019). En effet, une augmentation de la teneur en acide 3,5-dihydroxybenzoïque a été détectée après inoculation de *N. parvum* sur du bois de vigne, parallèlement à la diminution de la teneur en resvératrol (Labois et al., 2020). La capacité à oxyder et à polymériser le resvératrol en l'un de ses dimères, la *delta*-viniférine, dans du bois de vigne réduit en poudre a été montrée pour *Botryosphaeria obtusa* (Ascomycota, Botryosphaeriaceae), une espèce associée au BDA (Djoukeng et al., 2009). Fmed possède les enzymes (laccases, peroxydases) capables d'oxyder et de polymériser le resvératrol ou le ptérostilbène (Ponzoni et al., 2007; Wilkens et al., 2010; Floudas et al., 2012). La capacité d'une d'entre elles (une laccase) à dégrader le resvératrol a été montrée *in vitro* et quatre produits de dégradation ont été observés. Les données de spectrométrie de masse de deux d'entre eux pourraient correspondre à des dimères de stilbènes (m/z 471 [M-H]⁻ et 499 [M-H]⁻) (Abou-Mansour et al., 2009). Il est intéressant de noter que bien que ces espèces ne soient pas considérées comme des pourritures blanches, des activités laccase et Manganèse Peroxydase (MnP) ont également été montrées pour les *Botryosphaeriaceae* *N. parvum* et *D. seriata* (Esteves et al., 2014; Stempien et al., 2017).

2.3. Autres extractibles impliqués dans la durabilité des bois de forêt et de vigne

Les extractibles identifiés dans le bois appartiennent à des familles variées. On peut les distinguer en deux grands groupes, les polyphénols, dont font partie les stilbénoides, et les polycétides. Les principaux extractibles de bois sains de forêt ou de vigne, hors stilbénoides, sont listés en Annexe 2. Leurs principales caractéristiques chimiques et biologiques sont détaillées dans cette partie.

2.3.1. Les extractibles polyphénoliques (hors stilbénoides)

2.3.1.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont une famille de polyphénols synthétisés *via* la voie des phénylpropanoïdes (Figure 9), et dont le squelette commun est composé de deux cycles aromatiques, comme les stilbénoides, mais reliés par trois atomes de carbone, généralement sous forme de cycle oxygéné (Figure 9, Liu et al., 2021). Différentes classes de flavonoïdes peuvent être définies en fonction de leur structure chimique : les chalcones, flavanones, dihydroflavonols, auronnes,

Introduction

flavones, isoflavones, flavan-4-ols (ou phlobaphènes), flavonols, leucoanthocyanidines (ou flavan-3,4-ols), proanthocyanidines (ou flavan-3-ols), et anthocyanines (Figure 9). Les stilbènes sont également parfois considérés comme une classe de flavonoïdes du fait de leur voie de biosynthèse partiellement commune et de leur squelette de base proche. Tout comme les stilbènes, les flavonoïdes sont synthétisés à partir de coumaroyl-coA mais transformé par la chalcone synthase en naringénine chalcone, elle-même à l'origine de la quasi-totalité des flavonoïdes (Liu et al., 2021). Au moins une autre voie de biosynthèse de flavonoïdes existe, impliquant une cinnamate-CoA ligase qui convertit l'acide cinnamique en cinnamoyl-CoA, lui-même transformé ensuite par une chalcone synthase en pinocembrine chalcone, précurseur de la pinocembrine, une chalcone identifiée dans le bois de *P. sylvestris* (Fliegmann et al., 1992; Liu et al., 2021). Les flavonoïdes ont été identifiés dans l'ensemble des organes végétaux, dans le bois d'arbres forestiers mais également de vigne (Annexe 2), et peuvent être sujets à différentes modifications telles que des glycosylations, acylations ou polymérisations conduisant à au moins 9000 flavonoïdes identifiés dans les plantes (Martens and Mithöfer, 2005). Dans les tissus ligneux, parmi les flavonoïdes les plus étudiés on trouve les proanthocyanidines (flavan-3-ols), dont la catéchine, qui forment des polymères appelés tanins condensés (Yazaki, 2015). Ces polymères non hydrolysables ont la particularité de précipiter en milieu acide, devenant alors insolubles dans l'eau, contrairement aux flavonoïdes et aux tanins en général.

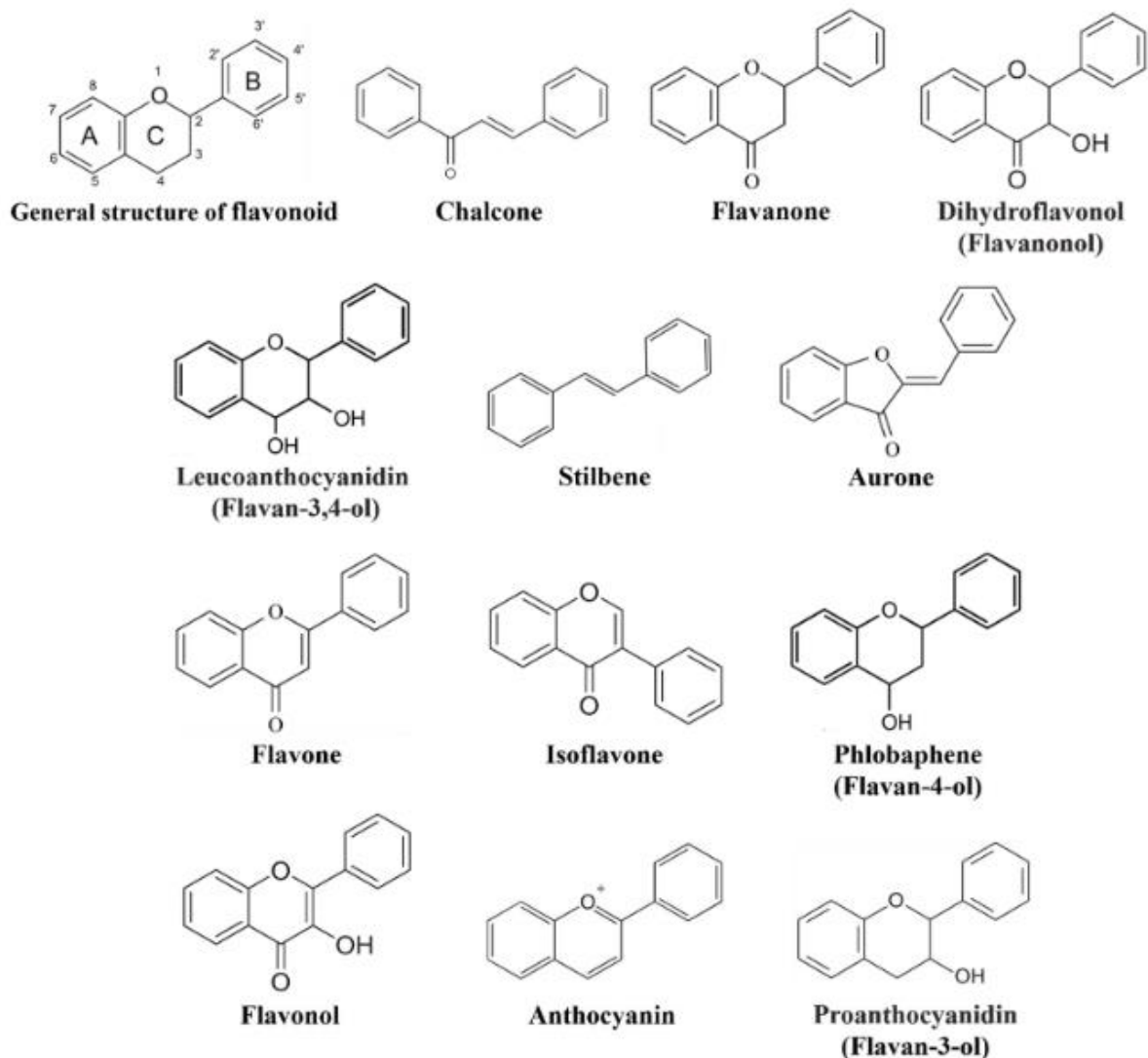


Figure 9: squelette de base des flavonoïdes et des principales classes de flavonoïdes (Liu et al., 2021).

2.3.1.2. Les tanins : définition

Les tanins sont une famille de polyphénols hydrolysables pouvant avoir une masse moléculaire relativement élevée, entre 500 et 3000 Da, ayant la propriété de précipiter les protéines en s'y liant (Rira, 2019). Ils regroupent plusieurs catégories selon leur composition chimique, les principales étant les tanins condensés, issus de la polymérisation de proanthocyanidines (catéchine par exemple, Figure 10a) et les tanins hydrolysables. Ces derniers sont des esters d'acide gallique ou de ses dérivés phénoliques (acide digallique, acide ellagique, acide hexahydroxyphénique, Figure 10b-d) avec un ose, généralement le glucose. Lorsque le composé phénolique est l'acide gallique ou l'acide digallique, on parle de gallotanins. Lorsqu'il s'agit de l'acide ellagique ou de l'acide hexahydroxyphénique, on parle d'ellagitanins. Ces derniers sont les plus fréquemment identifiés en particulier dans les bois des genres *Castanea*

Introduction

(châtaignier) et *Quercus* (chêne). Des tanins complexes sont également parfois retrouvés, résultant de la condensation d'un tanin hydrolysable avec un tanin condensé.

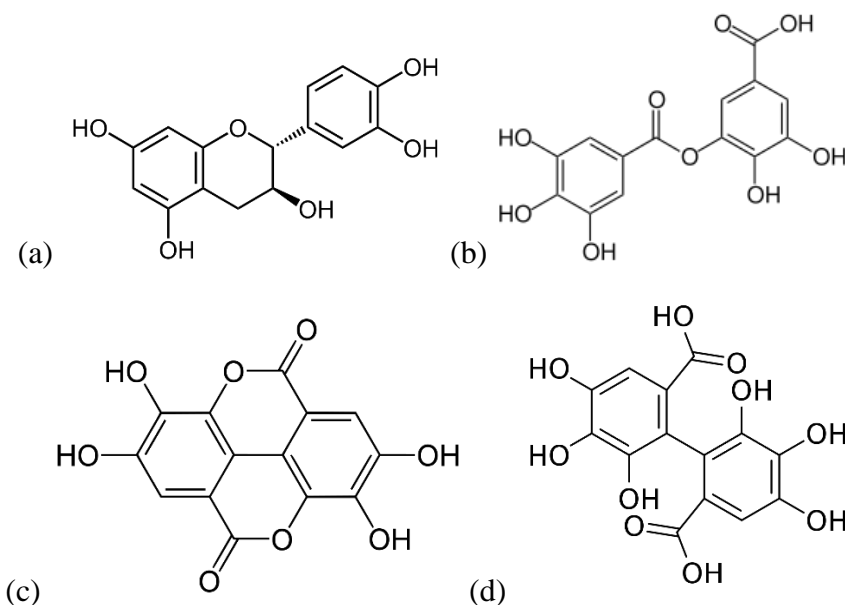


Figure 10: structure chimique (a) de la catéchine, une proanthocyanidine et unité de base de tanins condensés, (b) de l'acide digallique, formant des gallotanins, et de (c) l'acide ellagique et (d) l'acide hexahydroxyphénique, formant des ellagitanins.

2.3.1.3. Les lignanes

Les lignanes sont des composés phénoliques dérivés des monolignols, c'est-à-dire des sous-unités également précurseurs de la lignine, les alcools *para*-coumarylique, coniferylique et sinapylique (Davin and Lewis, 2003). Elles sont retrouvées dans des familles et divisions relativement éloignées telles que les *Pelliaceae* (plantes « primitives »), des fougères (Pterydophytes), des *Selaginellaceae*, des Gymnospermes et des Angiospermes, herbacées ou ligneuses. Il semble qu'au cours de l'évolution la structure des lignanes ait elle aussi évolué en des structures de plus en plus complexes et diversifiées (Davin and Lewis, 2003). Elles sont identifiées dans différentes espèces d'arbres forestiers, tels que *Abies alba* (Annexe 2 et Figure 11).

Introduction

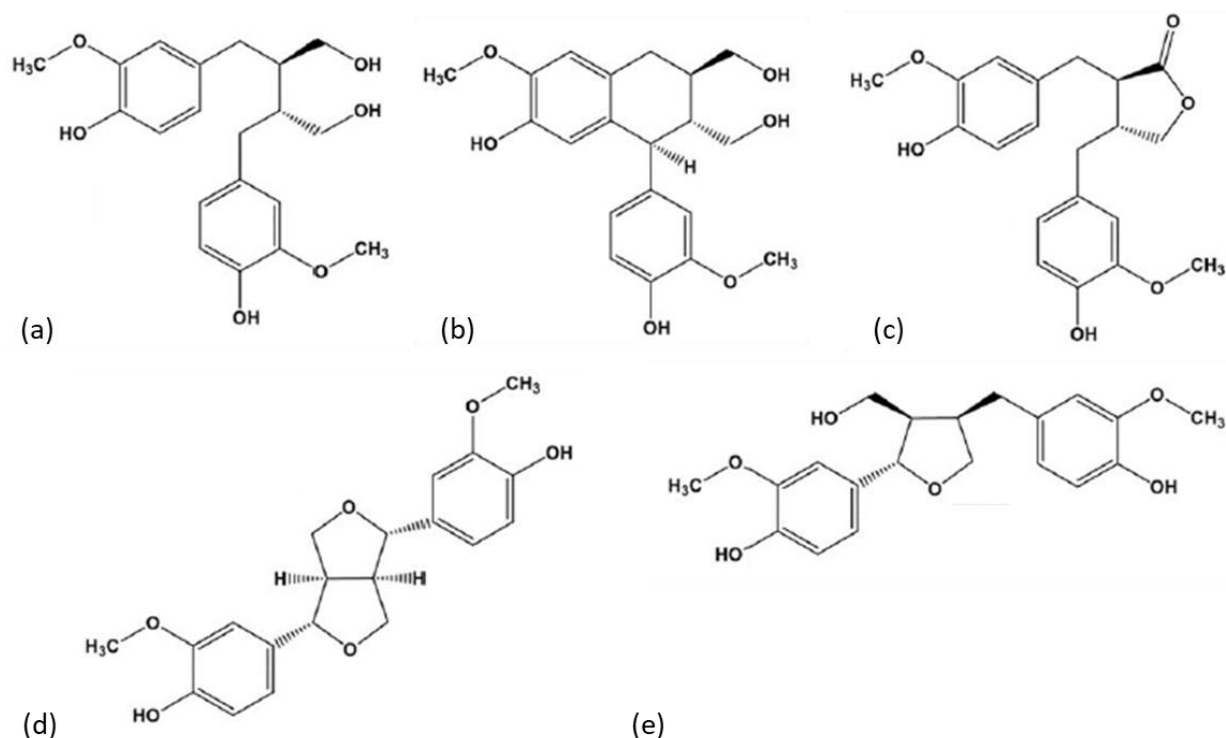


Figure 11: structure chimique des lignanes identifiées dans le bois de *Abies alba* : (a) sécoisolaricirésinol, (b) isolaricirésinol, (c) matairésinol, (d) pinorésinol, (e) laricirésinol (Vek et al., 2021).

2.3.1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont composés d'au moins un groupement phénolique et d'une fonction acide carboxylique, et peuvent être synthétisés à différentes étapes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (Vogt, 2010). Ils sont présents dans diverses espèces ligneuses (Annexe 2), et peuvent à la fois être des intermédiaires de composés plus complexes et avoir des propriétés biologiques importantes (voir partie 2.3.3.).

2.3.1.2. Les coumarines

Les coumarines sont une autre catégorie de polyphénols, dont le squelette de base est la 2H-1-benzopyrane-2-one (Figure 12a). Elles sont également issues de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, et plus rarement observées dans les parties ligneuses (racines majoritairement et écorce) de certaines espèces. C'est le cas par exemple de la scopolétine (Figure 12b) identifiée dans le bois et l'écorce de bois exotiques et dans du bois de chêne (Garcez et al., 1998; da Silva et al., 2009; Vogt, 2010).

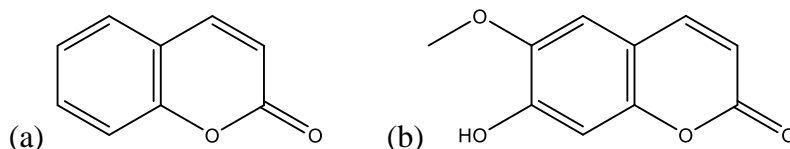


Figure 12: structure chimique des coumarines (a) 2H-1-benzopyrane-2-one (squelette de base des coumarines) et (b) scopolétine.

2.3.2. Les polycétides

Les polycétides sont un groupe de composés très variés, formés initialement de la condensation d'unités acétyle ou malonyle, sous l'action de polycétide synthases. Ce groupe inclut notamment les terpénoïdes, une famille importante d'extractibles dans les bois de forêt, et les acides gras.

2.3.2.1. Les terpénoïdes

Les terpénoïdes sont des métabolites spécialisés non phénoliques qui dérivent d'une ou plusieurs unité(s) d'isoprène ou 2,3-méthylbuta-1,3-diène (Figure 13a) *via* la voie de biosynthèse appelée voie du mévalonate. On peut classer les terpénoïdes en fonction de leur nombre d'atomes de carbone (C_n) et donc d'unités isoprénoïques, sous les termes d'hémiterpènes (une unité isoprène, C5), monoterpènes (C10, dont font partie les iridoïdes, des monoterpènes cycliques souvent à l'origine de la synthèse d'alcaloïdes), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterpènes (C25), triterpénoïdes (C30, desquels dérivent les stéroïdes) ou tetraterpènes (C40, ou caroténoïdes). La voie du mévalonate produit l'hémiterpène (C5) isopentenyl-5-pyrophosphate (IPP) à partir de mévalonate et de phosphate de déoxyulose, puis l'IPP fusionne avec son isomère le diméthylallylpyrophosphate (DMAPP) pour former un monoterpène (C10, puis les autres monoterpénoïdes sont successivement synthétisés par polymérisation avec une molécule d'IPP. Les terpénoïdes sont ensuite sujets à de nombreuses transformations à l'origine d'une grande diversité de molécules. Dans le bois, ils sont retrouvés notamment dans les résines de conifères, constituées à la fois de composés phénoliques, de monoterpènes et sesquiterpènes, généralement volatiles (sauf par exemple s'ils sont glycosylés), et d'acides résiniques (diterpènes), pas ou peu volatiles (Mansoor and Lockwood, 2007). Dans le bois de *Picea abies* par exemple ont été identifiés les mono- et sesquiterpènes *trans-allo-ocimène*, la γ -decalactone, le β -elemene, ou le calarene (Figure 13b-e) (Duan et al., 2020). Les acides abiétique (Figure 13f), pimarique, palustrique ou lévopimarique sont des exemples d'acides résiniques retrouvés dans le bois (entre-nœud) de *P. sylvestris* (Nerg et al., 2004). Les stéroïdes sont des terpénoïdes particuliers, formés à partir d'une cyclisation du triterpène 2,3-oxydosqualène ($C_{30}H_{48}O_2$) (Darnet et al., 2021). On en trouve par exemple dans le bois d'*Eucalyptus globulus*, où le sitostérol (Figure 13g) est le stéroïde majoritaire (Speranza et al., 2009).

Introduction

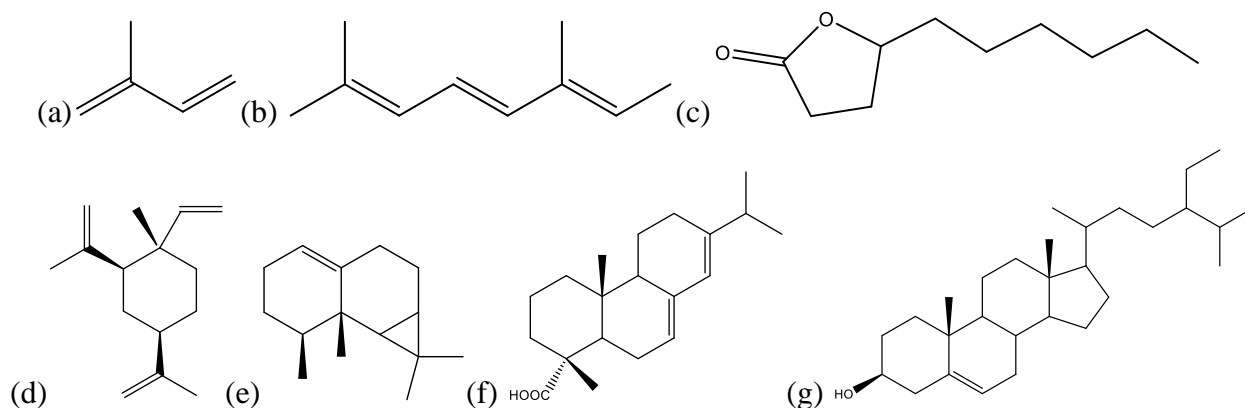


Figure 13: structure chimique de terpénoïdes de bois : (a) l'isoprène, (b) le trans- α -ocimène, (c) la γ -decalactone, (d) le β -élémente, (e) le calarène, (f) l'acide abiétique et (g) le β -sitostérol.

2.3.3. Les acides gras

Les acides gras sont des composés particulièrement apolaires, formés d'une chaîne aliphatique et d'un acide carboxylique. Dans le bois, ils sont le plus souvent sous forme estérifiée, soit liés à une molécule de glycérol (formant des glycérides) soit à des alcools (formant alors des cires). On trouve environ 0,3 à 0,4% de glycérides et 0,08 à 0,09% w/w ms dans le bois (Fengel and Wegener, 1984). Dans du bois de résineux (pin et épicéa), les acides gras majoritaires identifiés sont l'acide linoléique (9,12-18 :2, Figure 14a), l'acide oléique (9-18 :1, Figure 14b) et l'acide pinoléique (5,9,12-18 :3, Figure 14c) (Karlsson et al., 2001). La nomenclature utilisée permet de décrire leur structure chimique : les premiers chiffres indiquent la position des insaturations lorsqu'il y en a, suivis d'un tiret, puis le nombre de carbone et le nombre d'insaturations sont indiqués.

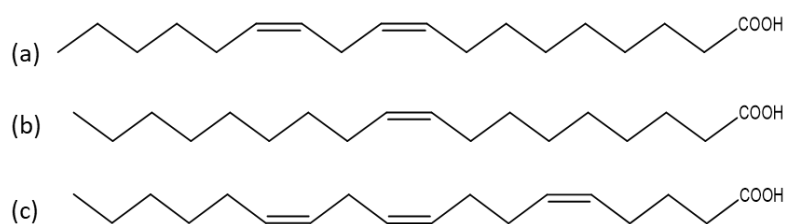


Figure 14: structure de 3 acides gras identifiés dans des extraits de pin et d'épicéa : acides (a) linoléique, (b) oléique et (c) pinoléique.

2.3.4. Facteurs influençant la composition en extractibles dans le bois

Tout comme les stilbénoides, les teneurs en extractibles pour chacune des familles décrites peuvent être fortement influencées par plusieurs facteurs, aussi bien dans le bois de forêt que celui de vigne. Par exemple, des teneurs supérieures en acides phénoliques et flavonoïdes ont été observées dans les tissus jeunes du bois de sapin blanc (bois de cœur et aubier), tandis que

Introduction

davantage de lignanes ont été observées dans le bois de cœur plus âgé (Vek et al., 2021). De plus, davantage d'extractibles totaux ont été observés au niveau des nœuds que dans le bois de cœur ou l'aubier. Dans le bois de *V. vinifera* subsp. *vinifera* et de *V. vinifera* subsp. *sylvestris*, des modifications de la composition en flavonoïdes ont été observées en réponse à l'inoculation du champignon pathogène *N. parvum* (Labois et al., 2020) : les teneurs en naringénine augmentent après inoculation alors que celles en catéchine et épicatechine diminuent. Il est possible que ces derniers aient été polymérisés afin de former des tanins condensés. Au contraire, les teneurs en trois flavonoïdes (annotés selon leurs données de fragmentation en spectrométrie de masse en tant que procyanidine A, 7-*O*-[3,4-dihydroxy-*E*-cinnamoyl-(\rightarrow 4)- β -D-glucuronopyranoside] apigenin 7-glycoside et 3'-*O*-(3,4,5-trihydroxybenzoyl)-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavan-(2 \rightarrow 7,4 \rightarrow 8)-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavane) augmentent dans des boutures de *V. vinifera* 'Cabernet Sauvignon' suite à l'inoculation de *P. chlamydospora* et *P. minimum* (Chervin et al., 2022). De même, les teneurs en flavonoïdes (flavanols et oligomères de flavanols) et en acide gallique dans le bois de *V. vinifera* 'Cabernet Sauvignon' sont supérieures dans le bois de pieds symptomatiques de l'Esca, à la fois dans les parties nécrotiques et saines (Rusjan et al., 2017). D'après ces études, plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de variations des teneurs en flavonoïdes dans le bois, notamment l'âge, la localisation et le type de tissu, le génotype de la plante, l'état physiologique de la plante mais aussi les pratiques culturales ou le temps d'exposition au champignon. Paradoxalement, il a été observé que l'acide gallique favorise la croissance *in vitro* de *P. chlamydospora* (jusqu'à 15% de croissance en plus) (Mugnai et al., 1999). Les effets des extractibles sur la croissance des champignons associés aux MDB, et inversement, ne sont donc pas encore totalement élucidés.

2.3.5. Propriétés antifongiques et antioxydantes des extractibles (hors stilbénoloïdes)

2.3.5.1. Propriétés antifongiques

Les extractibles décrits ci-dessus sont souvent associés à un rôle de défense de la plante face à un stress tel que l'attaque d'un agent pathogène. C'est le cas d'extractibles du sapin commun (*Abies alba*), en particulier d'extraits hydrophiles contenant notamment des lignanes, des acides phénoliques et des flavonoïdes, qui inhibent la croissance des champignons dégradateurs de bois *T. versicolor*, *Schizophyllum commune* (pourriture blanche) et *Gloeophyllum trabeum* (Vek et al., 2021). Les mécanismes antifongiques de ces familles d'extractibles sont multiples. Notamment, les propriétés antiradicalaires de lignanes de différents bois résineux et leur capacité à chélater des métaux, co-facteurs d'enzymes fongiques extracellulaires, tels que le fer, pourraient expliquer leur contribution à la durabilité du bois (Donoso-Fierro et al., 2009).

Introduction

Les flavonoïdes naturellement présents dans le bois ont une faible activité fongicide envers des champignons dégradateurs de bois *in vitro* (IC50 >800 ppm envers Tver, sauf pour la flavone non hydroxylée ou 2-phényl-1-benzopyran-4-one, rare naturellement dans le bois), suggérant qu'un tel mécanisme n'explique pas la contribution des flavonoïdes à la durabilité du bois (Binbuga et al., 2008). Les extractibles peuvent également jouer un rôle en modifiant la capacité du bois à absorber l'humidité, et donc à favoriser ou non des conditions propices à la croissance fongique (Nzokou and Kamdem, 2004; Vahtikari et al., 2017).

Parmi huit acides phénoliques (acides férulique, sinapique, gallique, chlorogénique, syringique, caféique, vanillique et *para*-coumarique) et cinq flavonoïdes (quercétine, épicatechine-gallate, catéchine, épicatechine et kaempférol) identifiés dans du bois de vigne et ajoutés au milieu de culture à 500 μ M (soit entre 82 et 221 μ g/mL), seul l'acide férulique inhibe la croissance mycélienne d'un des champignons associés à l'Esca, en l'occurrence *P. chlamydospora*, et deux composés semblent au contraire induire une plus forte croissance de *P. chlamydospora* (l'épicatechine-gallate) ou de *P. minimum* (l'acide *para*-coumarique) (Lambert et al., 2012).

La structure chimique des flavonoïdes comme le montre notamment l'effet de modifications jouent également un rôle sur leur toxicité. Par exemple, tout comme pour les stilbénoides, la glycosylation de flavonoïdes diminue leur toxicité, probablement du fait d'une modification de leur solubilité (Hopia and Heinonen, 1999). On peut également distinguer les modes d'action des extractibles plutôt hydrophiles (flavonoïdes, acides phénoliques, lignanes, etc.) des extractibles plutôt hydrophobes (terpénoides, tanins condensés, etc.). Les terpénoides sont les principaux constituants des oléorésines présentes dans les bois de résineux, également constituées de lipides. Cet ensemble très hydrophobe possède des propriétés antifongiques envers les champignons dégradateurs de bois, qui peuvent être expliquées au moins partiellement par le fait qu'il puisse chasser l'eau des cellules du bois et donc empêcher la diffusion de différentes molécules extracellulaires fongiques hydrophiles (Füchtner et al., 2020). La composition en terpénoides du bois de *P. sylvestris* de différentes origines et génotypes joue effectivement un rôle sur la durabilité de ces bois face à la pourriture blanche *C. puteana*, bien que d'autres facteurs, intrinsèques au bois ou environnementaux, soient probablement également impliqués (Nerg et al., 2004).

2.3.5.2. Propriétés antioxydantes

Les extraits de bois de *A. alba* contenant notamment des lignanes, des acides phénoliques et des flavonoïdes ont des propriétés antioxydantes *in vitro* proches de celles des références que

Introduction

sont l'acide gallique et de l'acide ascorbique (80% d'inhibition de l'oxydation du DPPH à 1g/L) (Vek et al., 2021). Des activités antioxydantes et antiradicalaires ont été montrées *in vitro* pour différents extraits ou extractibles (taxifoline et 5 lignanes) de bois de nœud de conifères (11 espèces) et de *Betula pendula* (Willför et al., 2003). Leurs IC₅₀ variaient de 8.1 µg/L (extrait de *Pinus contorta*) à 447 µg/L (extrait de *Thuja occidentalis*) au test de peroxydation lipidique (test au tert-butylhydroperoxide) et de 0.84 µg/L (stilbènes de *Pinus cembra*) à 171 µg/L (extrait de *Pinus sibirica*) au test de piégeage de l'ion superoxide (O₂^{•-}). Les auteurs suggèrent également un effet de synergie, ou encore la présence de composés encore non-identifiés dans les extraits, pour expliquer une plus forte activité antioxydante des extraits que des extractibles isolés.

3. Présentation de *Fomitiporia mediterranea* et *Trametes versicolor*, deux espèces de pourritures blanches

3.1. Principales caractéristiques de *F. mediterranea*

Fomitiporia mediterranea M. Fischer, 2002 (Fmed) est l'espèce majoritaire dans l'*amadou*, un des principaux symptômes de l'Esca, en Europe. Sa présence est corrélée à celle des symptômes foliaires de cette maladie du bois de la vigne. C'est un champignon de l'embranchement des *Basidiomycota*, de la classe des Agaricomycetes et de la famille des *Polyporaceae*. Sa répartition et ses caractéristiques ont fait l'objet d'une revue disponible en Annexe 3 (Publication n°4: Moretti et al., 2021). Une partie de ses caractéristiques est résumée ou précisée dans la partie suivante.

3.1.1. Caractéristiques morphologiques

Fmed possède un système d'hyphes dimitique, c'est-à-dire constitué de deux types d'hyphes : génératifs et squelettiques. Les premiers correspondent à la forme dicaryotique du mycélium, à l'origine des autres structures du carpophore (ou organe fructifère). Ils sont hyalins (c'est-à-dire translucides et incolores) et à paroi fine (Figure 15a). Les seconds sont végétatifs et font partie de la structure du carpophore. Ils sont typiquement plus large que les hyphes génératifs, à paroi épaisse et à faible croissance, aseptés (sans cloison transversale) et sans anse d'anastomose (également appelée boucle, consistant en un très court canal reliant des cellules hyphales séparées par une cloison), souvent non-branchés et à croissance longitudinale dans la chaire du carpophore (Teixeira, 1960). Le carpophore de Fmed (Figure 15b) est résupiné, c'est-à-dire sans pied, entièrement couché sur son substrat et ses différentes structures (chapeau,

Introduction

lame, tubes, hyménium) ne peuvent être séparées. Il a un aspect dur, mesure jusqu'à 15 mm d'épaisseur et est jaunâtre à brun. Il contient des basidiospores subglobuleux à ovales (Fischer, 2002; Fischer and Garcia, 2015; Moretti et al., 2021). La sporulation de *Fmed* est difficile à provoquer en conditions de laboratoire, et des tests de germination de spores *in vitro* ont donné de très faibles taux de germination (moins de 1%) à des temps de germination très variables (entre 8 jours et 4 semaines) (Fischer, 2002). Bien que les carpophores de *Fmed* soient relativement rares et difficiles à observer au vignoble, la sporulation est sa forme de dissémination la plus probable (Fischer, 2006).

Deux types de morphologies existent pour décrire le mycélium de *Fmed* en culture sur milieu solide (malt-agar) : le type « blanchissant » (type B) et le type « colorant » (type S) (Fischer, 2002; Moretti et al., 2021). Une même souche peut adopter une morphologie de type B ou S de façon encore peu expliquée. Le type B a un aspect cotonneux à duveteux et des hyphes aériens jaunâtres à brunâtres (Figure 16). Il colore faiblement le milieu de culture et a une croissance relativement rapide (par rapport au type S) : entre 2 et 3 mm par jour selon la température (entre 15 et 35°C). Le type S a des hyphes aériens éparses, colore moyennement à fortement le milieu de culture et a une croissance relativement lente : entre 1 et 1,8 mm par jour selon la température (Fischer, 2002).

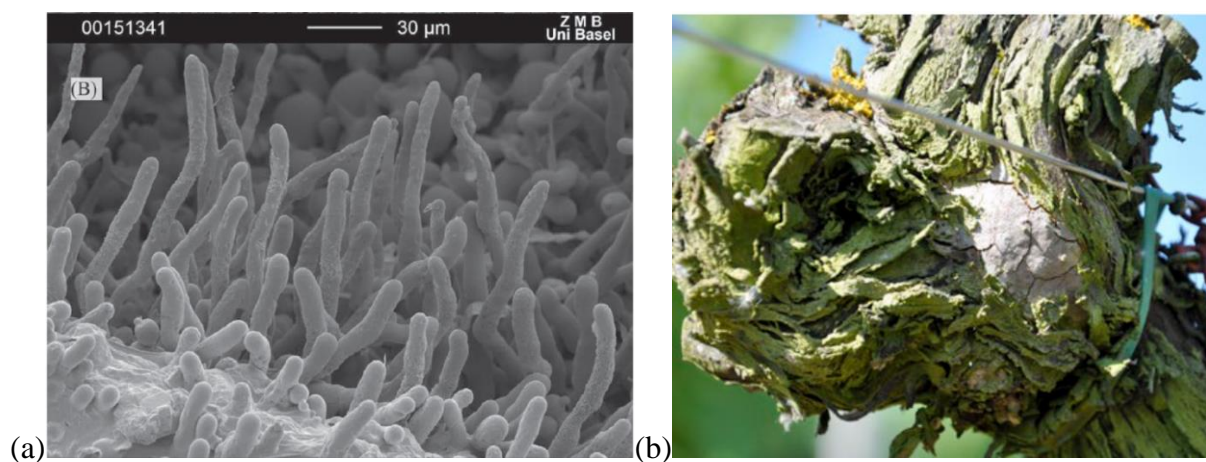


Figure 15 : (a) hyphes végétatifs squelettiques de *Fmed* prélevés d'un tronc de vigne affecté par l'Esca et observés au cryo-microscope électronique à balayage (Cryo-SEM) x 2000 (Moretti et al., 2021) et (b) carpophore de *Fmed* à proximité des plaies de taille d'un cep de vigne (en hiver en Europe centrale, © M. Fischer) (Fischer and Garcia, 2015).

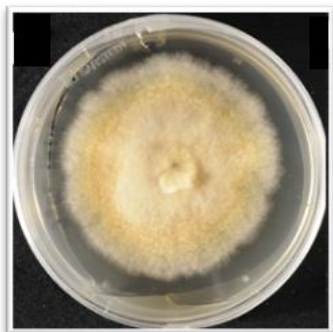


Figure 16 : morphologie (type B) de Fmed (souche phco36) sur malt-agar (2-3%) après 14 jours à 30°C (©Marion Schilling).

3.1.1.1. Répertoire enzymatique

Le génome de Fmed, entièrement séquencé en 2012 (Floudas et al., 2012), contient 63 354 420 paires de bases réparties en 11 333 gènes et est disponible sur le portail mycoCosm du Joint Genome Institut (JGI) (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home>). Dans le cadre d'une étude comparative entre 31 génomes de champignons, Floudas et al. (2012) ont annoté et comparé les gènes codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation et la détoxification du bois, aussi bien extracellulaires (CAZYmes, peroxydases, laccases, autres oxydoréductases) que intracellulaires (cytochromes P450s ou cytP450s, glutathion transférases ou GSTs). Ces gènes présents dans le génome de Fmed ont été décrits et sont donnés en Annexe 2. Parmi eux, 75 codants pour des CAZYmes ont été identifiés, 37 codants pour des oxydoréductases et 130 codants pour des cytP450s. Parmi les gènes codant pour des oxydoréductases, 11 codent pour des oxydases à multiples atomes de cuivre (MCO), dont font partie les laccases, et 17 pour des peroxydases de classe II, c'est-à-dire des peroxydases impliquées dans la dégradation de la lignine. Parmi ces dernières, le génome de Fmed présente 16 peroxydases à manganèse (MnPs) et 1 peroxydase générique. En s'intéressant plus particulièrement aux systèmes de détoxification de différentes espèces de champignons dégradeurs de bois, Morel et al. (2013) ont d'une part confirmé la présence de 130 cytP450s dans le génome de Fmed et détaillé leur classification, et d'autre part identifié 38 gènes codant pour des GSTs (voir Annexe 2 pour les familles de cytP450s et de GSTs). Comme décrit dans la partie 1 de cette introduction (Schilling et al., 2021), la nature des enzymes de dégradation et de détoxification que peut produire Fmed peut être d'une importance clé dans ses mécanismes d'adaptation à son substrat.

3.1.2. Classification

Fmed possède plusieurs familles d'enzymes pouvant être impliquées dans la dégradation de la lignine (peroxydases de classe II, MCOs dont laccases *stricto sensu*, autres oxydoréductases, ...) et est considéré comme une pourriture blanche. Il est intéressant de préciser ici que des

Introduction

études de génomique comparative impliquant les champignons dégradateurs de bois ont montré que la classification généralement acceptée entre pourritures blanches, brunes ou molles relève plutôt d'un *continuum*, traduit par des caractéristiques intermédiaires pour certaines espèces (Riley et al., 2014; Floudas et al., 2015; Nagy et al., 2016, 2017b, 2017a). Les pourritures blanches et brunes sont majoritairement des *Basidiomycota*, tandis que les *Ascomycota* sont plus représentatifs des pourritures molles et considérés comme ancestraux aux *Basidiomycota*. Ces dernières sont généralement capables de se développer dans des conditions environnementales plus extrêmes, telles qu'un très fort ou très faible taux d'humidité (Blanchette et al., 2004). Les pourritures blanches sont définies par leur capacité à dégrader totalement la lignine, notamment grâce à la production d'enzymes spécifiques (en particulier les peroxydases de classe II). Cependant, certaines espèces (des genres *Botrybasidium* et *Tulasnella* par exemple, deux *Basidiomycota* des familles *Botrybasidiaceae* et *Tulasnellaceae* respectivement) sont associées à de la pourriture blanche mais ne possèdent pas de peroxydases de classe II, et leurs mécanismes exacts de dégradation du bois, dont la lignine, ne sont pas encore totalement élucidés. Inversement, certaines espèces considérées comme des pourritures brunes possèdent des gènes codant pour des enzymes capables de dégrader la lignine (bien qu'ils soient moins abondants qu'au sein des pourritures blanches). Ceci peut s'expliquer au moins en partie par le fait que les pourritures blanches sont considérées comme les ancêtres des champignons dégradateurs de bois, et que leur évolution aurait donné naissance aux pourritures brunes par la perte des gènes codant pour les enzymes capables de dégrader la lignine. Cette évolution aurait eu lieu plusieurs fois, résultant à des pourritures blanches et brunes dans plusieurs ordres phylogénétiques, tels que les *Hymenochaetales* ou les *Polyporales*. L'évolution des champignons dégradateurs de bois a également conduit à des spécificités liées aux enzymes associées à la dégradation des hémicelluloses et de la cellulose (CAZYmes), cependant encore peu comprises (Floudas et al., 2015; Nagy et al., 2016, 2017a).

Une autre manière de classer les champignons est de les considérer selon leur mode de vie (Suzuki and Sasaki, 2019; Akhtar et al., 2020) : les champignons saprotrophes sont ceux se nourrissant de matière organique morte, et sont les plus rencontrés dans le cas des champignons dégradateurs de bois ; par opposition, les biotrophes ont besoin d'un hôte vivant duquel ils puisent leurs ressources pour se développer, et peuvent lui être bénéfiques (symbiotiques), neutres (commensaux) ou lui nuire (parasites) ; les nécrotrophes tuent les cellules de leur hôte pour se nourrir ensuite de matière organique morte ; certains organismes adoptent dans un premier temps un mode de vie biotrophe puis nécrotrophe, ce sont les hémibiotrophes ; les endophytes sont des organismes vivant au sein des tissus de leur hôte sans lui nuire

Introduction

(symbiotiques ou commensaux), par opposition aux pathogènes, qui vivent aux dépens de leur hôte, causant soit uniquement des désordres physiologiques ou maladies (parasitisme) soit la mort de leur hôte. Comme suggéré par ces définitions, une espèce peut appartenir à plusieurs de ces catégories. De plus, certaines espèces peuvent adopter plusieurs de ces modes de vie en fonction de leur cycle de vie ou de leur environnement, comme c'est le cas par exemple pour des endophytes pouvant devenir pathogènes en fonction de l'état physiologique de la plante, des conditions environnementales ou des communautés microbiennes présentes. Des études *in vitro* ont montré que Fmed est capable de se développer sur bois mort (Larignon and Dubos, 1997; Pacetti et al., 2022). Il pourrait donc être considéré comme saprotrophe. Cependant, il est également à l'origine de pourriture blanche (Larignon and Dubos, 1997; Sparapano et al., 2000, 2001; Laveau et al., 2009), de nécroses ou de décolorations du bois (Elena et al., 2006; Markakis et al., 2017, 2019) lorsqu'il est inoculé sur du bois vivant (boutures en pots ou bois détachés) de vigne ou d'autres espèces ligneuses, et pourrait donc être considéré comme nécrotrophe. De plus, l'observation de symptômes foliaires de l'Esca a été associée à sa présence dans le bois (Del Frari et al., 2021), et la technique de curetage, consistant à retirer mécaniquement l'*amadou* des ceps montrant des symptômes d'Esca au vignoble, conduit à une résilience significative des ceps (Cholet et al., 2021; Pacetti et al., 2021). Ces observations suggèrent un caractère pathogène. Pourtant, le mode de vie et en particulier ce caractère pathogène de Fmed fait encore débat actuellement, avant tout du fait qu'aucun lien de cause à effet (postulat de Koch) n'a pu être démontré entre la présence de Fmed dans le bois et les symptômes foliaires de l'Esca (Moretti et al., 2021), mais également du fait qu'après inoculation sur bois vivant, des nécroses ne sont pas systématiquement observées, soit pas de manière significative soit uniquement sur bois âgé (Larignon and Dubos, 1997; Luque et al., 2009). Les modes de vie saprotrophe ou biotrophe (symbiotique ou pathogène) sont probablement issus d'un *continuum* au cours de l'évolution et de l'adaptation des champignons (Veneault-Fourrey and Martin, 2011). Ce *continuum* se traduit notamment par les répertoires enzymatiques d'espèces adoptant l'un ou l'autre de ces modes de vie. Par exemple, des gènes codant pour des CAZymes nécessaires aux saprotrophes (codants pour des GH6 et 7 ou des xylanases notamment) auraient été perdus par les organismes symbiotiques et pathogènes. Les champignons symbiotiques ou pathogènes seraient également plus dépendants de leur hôte pour l'assimilation de certains nutriments tels que l'azote, et auraient perdu la capacité à assimiler certaines formes d'azote (nitrate ou sulfate). Au contraire, ces derniers produisent des petites protéines sécrétées indispensables à la communication avec leur hôte, contrairement aux saprotrophes. Le répertoire enzymatique, nécessaire par exemple à la croissance ou à l'assimilation des nutriments par une espèce fongique, est donc un élément clé pour mieux

Introduction

comprendre le mode de vie de cette espèce et son impact sur son hôte. Mieux comprendre les mécanismes de croissance et de dégradation du bois de Fmed peut ainsi contribuer à mieux comprendre la nature de sa relation avec la vigne.

3.2. Principales caractéristiques de *T. versicolor*

Trametes versicolor (L.) Lloyd, 1921 (*syn. Coriolus versicolor, Polyporus versicolor*) (Tver) est un champignon de l'embranchement des *Basidiomycota*, de la classe des *Agaricomycetes* et de la famille des *Polyporaceae*. Il est retrouvé uniquement sur bois mort et sur un grand nombre d'espèces, principalement de feuillus mais également quelques résineux. Il est donc considéré comme saprophyte et généraliste (Deroy, 2015). Il est également un modèle d'étude à la fois pour ses mécanismes de dégradation du bois que dans d'autres domaines tels que la médecine (Habtemariam, 2020; Tišma et al., 2021). Tver est, tout comme Fmed, un champignon de pourriture blanche, car il est capable de dégrader la lignine grâce notamment à ses peroxydases de classe II (Floudas et al., 2012). Ces dernières appartiennent à des familles de peroxydases de classe II différentes de celles de Fmed, comme détaillé ci-après. L'ensemble de ces caractéristiques a conduit à choisir Tver comme modèle d'étude au cours des chapitres 1 et 2, en comparaison à Fmed, afin d'éventuellement mettre en évidence des spécificités de Fmed selon son substrat.

Le système hyphal de Tver est trimitique (Figure 17a), c'est-à-dire qu'il possède trois types d'hyphes : génératifs, squelettiques et ligatifs (ou conjonctifs). Ces derniers sont végétatifs, comme les hyphes squelettiques, mais plus minces, tortueux, à paroi épaisse et ramifiés (Teixeira, 1960). Cet ensemble donne une structure rigide au carpophore, également communément appelé polypore (Figure 17b).

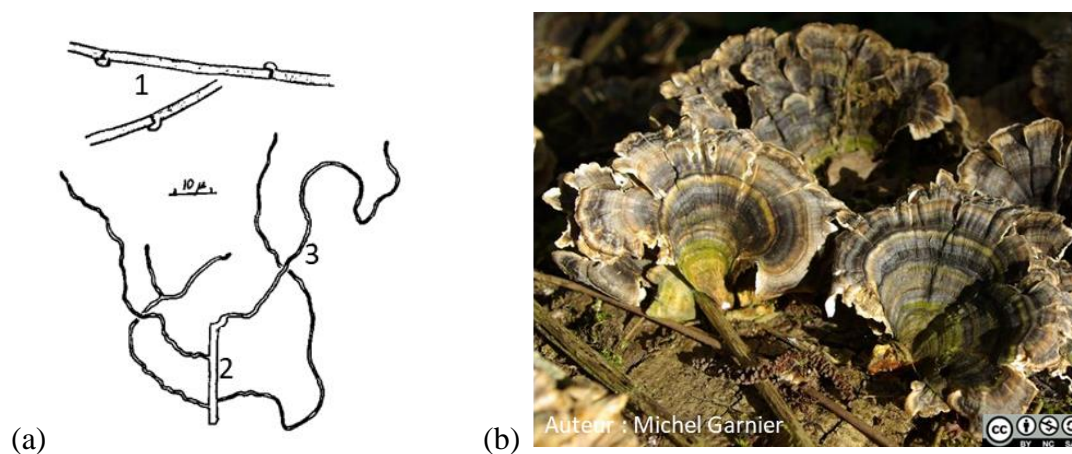


Figure 17: (a) schéma du système hyphal trimitique de Tver (1) hyphes génératifs hyalins à paroi très fine, à septations noueuses et avec des anses d'anastomose (ou boucles) simples ; (2) hyphes squelettiques, plus larges et à paroi épaisse et (3) hyphes ligatives plus minces et sinueuses (Teixeira, 1960) ; et (b) morphologie du carpophore (ou polypore) de Tver sur bois mort en forêt (photographie Michel Garnier modifiée de https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/44911/tab/fiche, le 25/09/2022).

Introduction

Le génome de Tver a été entièrement séquencé (Floudas et al., 2012) et contient 44 794 008 paires de bases réparties en 14 296 gènes (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home>). Les gènes codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation et la détoxification du bois présents dans le génome de Tver sont donnés dans l'Annexe 2. Parmi eux, 79 codent pour des CAZymes, 37 pour des oxydoréductases, dont 10 MCO et 17 peroxydases de classe II, 190 pour des cytP450s et 38 pour des GSTs. Parmi les peroxydases de classe II, le génome de Tver présente 13 MnPs, 10 peroxydases à lignine (LiPs) et 3 peroxydases versatiles (Floudas et al., 2012; Morel et al., 2013).

Fmed et Tver sont donc deux espèces de pourriture blanche évoluant dans des niches écologiques différentes, et dont les répertoires enzymatiques associés à la dégradation du bois et à la détoxification sont connus et différents. Une niche écologique est un ensemble de facteurs dans lequel évolue un organisme, biotiques (réponse éventuelle de l'hôte, compétition avec différents organismes ou micro-organismes, etc.) ou abiotiques (conditions environnementales, climatiques, etc.). La composition structurale et chimique du substrat, le bois dans le cas des champignons dégradateurs de bois, est un de ces facteurs. La comparaison des mécanismes mis en œuvre par ces dernières sur différents substrats pourrait donc permettre de mettre en évidence des facteurs d'adaptation de chaque espèce.

4. Objectifs de la thèse

Le principal objectif de cette thèse est d'étudier les mécanismes d'adaptation de Fmed à sa niche écologique, en nous focalisant tout d'abord sur son substrat, le bois de vigne. La première étape sera d'observer sa capacité à dégrader différents substrats ligneux, en particulier des sciures de bois de vigne, hêtre et épicéa, et de décrire son comportement. Les différences éventuelles observées en fonction du substrat et en comparaison avec Tver, devraient permettre de mettre en évidence des mécanismes spécifiques de Fmed. Des outils permettant d'appréhender la physiologie du champignon (observation de sa morphologie et de son schéma de dégradation, suivi de la minéralisation du carbone et de la perte de masse du substrat), et des analyses de métabolomique ciblée (teneurs en extractibles) et de protéomique (sécrétome principalement) seront investis. La deuxième étape permettra d'observer le comportement et les mécanismes de dégradation et de détoxification de Fmed sur différents substrats ligneux en prenant en compte la dimension tridimensionnelle du bois. Celle-ci pourrait en effet jouer un rôle notamment sur l'accessibilité des nutriments ou des extractibles. Dans cette étape, en plus d'approches physiologiques et protéomiques, une approche métabolomique non-ciblée (spectrométrie de masse en tandem et réseaux moléculaires) sera également utilisée afin

Introduction

d'explorer l'ensemble des modifications, dégradations ou productions de métabolites lors des interactions bois-champignons. Les résultats seront ensuite discutés au regard des autres facteurs formant la niche écologique dans laquelle évolue Fmed, et de leur(s) potentiel(s) impact(s) sur les mécanismes d'adaptation de Fmed.

Chapitre 1 : Mécanismes de dégradation du bois par *F. mediterranea* sur différentes essences de sciures de bois

1. Etude de la dégradation du bois de vigne, hêtre et épicéa en sciures par *F. mediterranea* : approches physiologique, métabolomique et protéomique (Publication n°2)

Publication n°2 : Schilling, M., Maia-Grondard, A., Baltenweck, R., Robert, E., Hugueney, P., Bertsch, C., et al. (2022). Wood degradation by *Fomitiporia mediterranea* M. Fischer: physiologic, metabolomic and proteomic approaches. *Frontiers in Plant Science* 13, 988709. doi: 10.3389/fpls.2022.988709.

Supplementary Material :

Les tableaux et figures complémentaires sont ajoutés p.95 à 98 (Table S2, Figure S1 et Figure S2), et/ou sont disponibles sous le lien ci-dessous (Table S1) :

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.988709/full#supplementary-material>



OPEN ACCESS

EDITED BY
Gry Alfredsen,
Norwegian Institute of Bioeconomy
Research (NIBIO), Norway

REVIEWED BY
Katie M. Ohno,
United States Forest Service (USDA),
United States
Federico Vita,
University of Bari Aldo Moro, Italy

*CORRESPONDENCE
Marion Schilling
marion.schilling@univ-lorraine.fr
Eric Gelhaye
eric.gelhaye@univ-lorraine.fr

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Technical Advances in Plant Science,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

RECEIVED 07 July 2022
ACCEPTED 16 August 2022
PUBLISHED 26 September 2022

CITATION
Schilling M, Maia-Grondard A,
Baltenweck R, Robert E, Huguene y P,
Bertsch C, Farine S and Gelhaye E (2022)
Wood degradation by *Fomitiporia*
mediterranea M. Fischer: Physiologic,
metabolomic and proteomic approaches.
Front. Plant Sci. 13:988709.
doi: 10.3389/fpls.2022.988709

COPYRIGHT
© 2022 Schilling, Maia-Grondard,
Baltenweck, Robert, Huguene y, Bertsch,
Farine and Gelhaye. This is an open-access
article distributed under the terms of the
[Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in
other forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the original
publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

Wood degradation by *Fomitiporia mediterranea* M. Fischer: Physiologic, metabolomic and proteomic approaches

Marion Schilling^{1*}, Alessandra Maia-Grondard²,
Raymonde Baltenweck², Emilie Robert³, Philippe Huguene y²,
Christophe Bertsch⁴, Sibylle Farine⁴ and Eric Gelhaye^{1*}

¹Université de Lorraine, INRAE, IAM, Nancy, France, ²Université de Strasbourg, INRAE, SVQV UMR-A 1131, Colmar, France, ³Université de Lorraine, INRAE, A2F, Nancy, France, ⁴Laboratoire Vigne Biotechnologies et Environnement UPR-3991, Université de Haute Alsace, Colmar, France

Fomitiporia mediterranea (Fmed) is one of the main fungal species found in grapevine wood rot, also called "amadou," one of the most typical symptoms of grapevine trunk disease Esca. This fungus is functionally classified as a white-rot, able to degrade all wood structure polymers, i.e., hemicelluloses, cellulose, and the most recalcitrant component, lignin. Specific enzymes are secreted by the fungus to degrade those components, namely carbohydrate active enzymes for hemicelluloses and cellulose, which can be highly specific for given polysaccharide, and peroxidases, which enable white-rot to degrade lignin, with specificities relating to lignin composition as well. Furthermore, besides polymers, a highly diverse set of metabolites often associated with antifungal activities is found in wood, this set differing among the various wood species. Wood decayers possess the ability to detoxify these specific extractives and this ability could reflect the adaptation of these fungi to their specific environment. The aim of this study is to better understand the molecular mechanisms used by Fmed to degrade wood structure, and in particular its potential adaptation to grapevine wood. To do so, Fmed was cultivated on sawdust from different origins: grapevine, beech, and spruce. Carbon mineralization rate, mass loss, wood structure polymers contents, targeted metabolites (extractives) and secreted proteins were measured. We used the well-known white-rot model *Trametes versicolor* for comparison. Whereas no significant degradation was observed with spruce, a higher mass loss was measured on Fmed grapevine culture compared to beech culture. Moreover, on both substrates, a simultaneous degradation pattern was demonstrated, and proteomic analysis identified a relative overproduction of oxidoreductases involved in lignin and extractive degradation on grapevine cultures, and only few differences in carbohydrate active enzymes. These results could explain at least partially the adaptation of Fmed to grapevine wood structural composition compared to other wood species, and suggest that other biotic and abiotic factors should be considered to fully understand the potential adaptation of Fmed to its ecological niche. Proteomics data are available via ProteomeXchange with identifier PXD036889.

KEYWORDS

Esca, white rot, *Fomitiporia mediterranea*, grapevine wood, adaptation

Introduction

Grapevine, *Vitis vinifera* L., is one of the most economically important cultures in the world: it is produced worldwide and its production value was estimated to more than \$73billions in 2018 (Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics (FAOSTATS), 2021). This high valued production is however threatened by many vineyard diseases. Among them, Grapevine Trunk Diseases (GTDs) are considered as the most challenging one (Reis et al., 2019). In 2012 and 2013, economic losses of, respectively, 11 and 13% of the French vineyard were attributed to GTDs (Doublet et al., 2014). No satisfying treatment exists yet, even if promising solutions developments are ongoing (Gramaje et al., 2018; Mondello et al., 2018).

Esca is one of the main GTDs, causing alone 3% of French vineyard economical losses in 2013 (Doublet et al., 2014). Its importance tends to increase over the last years in France and other European countries (Bruez et al., 2013; Guerin-Dubrana et al., 2019). Esca affects mainly mature vines and is considered as a complex of diseases, associated with various fungal species and symptoms (Mugnai et al., 1999; Surico et al., 2008; Lecomte et al., 2012; Bruez et al., 2014). Esca symptoms are usually grouped into five syndromes described as: (i) brown wood streaking, affecting rooted cuttings and, associated with internal brown wood necrosis, (ii) Petri disease, affecting young vines and associated with wood and crown symptoms but also foliar symptoms such as leaf chlorosis and yield or vigor loss, (iii) Young Esca or Grapevine Leaf Stripe Disease (GLSD), associated with wood and crown symptoms as well as foliar symptoms such as the typical “tiger-striped” leaves or even apoplexy of the vine, (iv) Esca, affecting mainly mature vines, characterized by typical white-rot in wood and also called “amadou,” and (v) Esca proper, a combination of GLSD and Esca syndromes (Surico, 2009; Bertsch et al., 2013). Among the GTD-associated fungi, *Phaeoaniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium minimum* were the main identified species in wood necrosis observed in the first three described syndromes (brown wood streaking, Petri disease and young Esca; Surico, 2009). In wood affected by Petri disease, *P. chlamydospora* is the main identified fungal species but up to 36 other species were also isolated, including *P. minimum* and *Cadophora luteo-olivacea* as the most prevalent (Pilar Martínez-Diz et al., 2021). Other species not directly associated with Esca such as *Eutypa lata* or *Pleurostomophora richardsiae* could also be present in wood necrosis, and the role of each associated fungus is still not fully understood (White et al., 2011; Canale et al., 2019). In white-rot associated with Esca and Esca proper syndromes, the main identified fungi are Basidiomycota and the main genus is *Fomitiporia*. In Europe, the most represented species is *Fomitiporia mediterranea* (Fmed) M. Fischer (Hymenochaetales, Basidiomycota; Fischer, 2002; Surico et al., 2008; Bruez et al., 2020; Moretti et al., 2021).

Grapevine trunk diseases (GTDs)-associated fungi colonize grapevine wood but not the leaves. Their role in foliar symptoms still need further research (Fontaine et al., 2016; Del Frari et al.,

2021). More particularly for Fmed, evidence for its pathogenicity *stricto sensu* is still lacking. *In vitro*, Fmed indeed induces necrosis on detached grapevine wood (Markakis et al., 2017) and inhibits growth of grapevine protoblasts (Bruno and Sparapano, 2006a). After inoculation, Fmed is able to induce white-rot only on mature vines, but without typical Esca foliar symptoms (Moretti et al., 2021). Still, curettage of Esca-affected vines which consists of removing white-rot zone, where Fmed is found in majority, improves vine resilience and reduces Esca symptoms the following years (Cholet et al., 2021; Pacetti et al., 2021). Moreover, Fmed was found in higher abundance in wood showing foliar symptoms (Del Frari et al., 2021). One hypothesis of these observations is that Esca leaf symptoms might require the presence in wood of both Fmed, or other *Hymenochaetales*, and tracheomycotic fungi (Del Frari et al., 2021).

Fmed could be functionally classified as a white-rot fungus (WRF), as it is able to mineralize all wood structure components, including lignin, the most recalcitrant one (Floudas et al., 2012; Sahu et al., 2021). Due to grapevine wood specificities, Fmed might be specifically adapted to grow on this wood species (Schilling et al., 2021). As with other WRF, genomic studies revealed that Fmed has a large variety of enzymes which could be involved in the extracellular degradation of lignin, and in particular class II peroxidases (Class-II PODs) and laccases. Class-II PODs are classified upon their structure and function as Manganese Peroxidases (MnPs), Lignin Peroxidases (LiPs), Versatile Peroxidases (VPs) and Generic Peroxidases (GPs). The Fmed genome harbors 16 gene encoding MnPs (including 3 short MnPs, 11 long MnPs and 2 atypical MnPs), and 1 gene encoding a GP (Floudas et al., 2012). In contrast with other fungi such as *Trametes versicolor* (Tver; L.) Lloyd, 1921 (Polyporaceae, Polyporales, and Basidiomycota), a WRF found on a large range of forest hardwoods and some softwoods, no genes encoding LiPs or VPs were found. LiPs cleave lignin β -1 linkage (non-aromatic part) at their typical catalytic tryptophan site, by oxidation and in the presence of hydrogen peroxide as electron acceptor (Falade et al., 2017), while MnPs possess a manganese (II) oxidation site and use chelated manganese (III) ions as electron donor, to oxidize lignin phenolic structures (Hofrichter, 2002). Concerning VPs, they exhibit both a catalytic tryptophan site, like LiPs, and a manganese (II) oxidation site, like MnPs, whereas GPs show none of them. The latter probably act by oxidizing their substrate at their main heme channel (Floudas et al., 2012). The functional differences between LiPs and MnPs were suggested to be involved in specific WRF lignin degradation capacity, depending on lignin composition (Suzuki et al., 2012). Two main degradation patterns were described for WRF: (i) simultaneous (or nonselective), when lignin, cellulose and hemicelluloses are simultaneously degraded, or (ii) selective (or preferential), when lignin is preferentially degraded (Blanchette, 1991). However, it was not shown if LiPs or MnPs could favor one of the two patterns. For example, two WRF, Tver and *Phanerochaete chrysosporium* strain BKM F-1767, both possessing LiPs and MnPs, were shown to cause, respectively, simultaneous and selective degradation (Blanchette et al., 1989).

Laccases are multicopper oxidases acting on a large range of substrates, including lignin and lignin residues, reducing O_2 to H_2O (Reiss et al., 2013; Manavalan et al., 2015). However, their role in lignin degradation remains unclear. These enzymes are able to oxidize phenolic compounds suggesting also a role in detoxification of potential toxic compounds found in wood and in particular in grapevine wood. Fmed genome analysis revealed the presence of ten genes encoding laccases (*sensu stricto*) and one Fet3 ferroxidase (Floudas et al., 2012). Recent investigation of laccases and MnPs activities in Fmed culture media confirmed their importance for Fmed growth on wood (Pacetti et al., 2022).

Enzymes involved in polysaccharide degradation, in particular hemicelluloses and cellulose, belong to Carbohydrate-Active enZymes (CAZYS). They can be highly specific relative to sugar units or linkage types (King et al., 2011; Hage and Rosso, 2021). Among them, Glycoside Hydrolases (GHs) catalyze polysaccharide hydrolysis with high carbohydrate and sugar conformation specificities (Coines et al., 2019). Depending on their molecular mechanisms they are classified into 173 families (AFMB, 2022b). The Fmed genome exhibits 50 GHs from nine families. Carbohydrate Esterases (CEs) catalyze O- or N-deacetylation of heteropolysaccharides, i.e., hemicelluloses and pectins, and are further classified into 20 families (AFMB, 2022a). They are key enzymes to enable further polysaccharide depolymerization by GHs. Twelve genes encoding CEs from four families were detected in the Fmed genome (Floudas et al., 2012). Auxiliary activity enzymes are redox enzymes acting conjointly with CAZYS. Firstly classified as GH61 family, Lytic Polysaccharides Mono-Oxygenases (LPMOs) are now classified as Auxiliary Activity enzymes family 9 (AA9), since evidence for their oxidative activity involved in polysaccharides degradation was obtained (Rani Singhania et al., 2021). Thirteen genes encoding LPMOs were identified in the Fmed genome (Floudas et al., 2012).

Wood not only contains structural components, but also extractives, which are small molecules or metabolites easily extractible with solvent, often associated with antimicrobial or antifungal properties and involved in wood durability (Valette et al., 2017; Perrot et al., 2020). Grapevine wood extractives belong mainly to the stilbene family or to other phenolics such as flavonoids or phenolic acids. Many of them are known for their antifungal and antioxidant activities (Jeandet et al., 2002). Antifungal activities against Fmed were demonstrated *in vitro* for six stilbenes (resveratrol, pterostilbene, miyabenol C, isohopeaphenol, and vitisin A and B; Bruno and Sparapano, 2006b; Lambert, 2011; Lambert et al., 2012). However, as shown with other wood-decaying fungi, Fmed has developed both intracellular and extracellular detoxification processes to deal with such extractives. Intracellular detoxification by wood-decaying fungi involve enzymes constituting the fungal xenome, which is mainly represented by cytochrome P450s and glutathione transferases (Morel et al., 2013; Morel-Rouhier, 2021). The Fmed genomes showed, respectively, 130 and 38 genes encoding for those two enzymes families (Floudas et al., 2012; Morel et al.,

2013). In parallel, Fmed extracellular detoxification was suggested, but mechanisms remain not fully understood. It was shown that the presence of resveratrol in Fmed cultures induced laccase activity and a decrease of resveratrol concentration, concomitantly to the production of two non-identified by-products (Bruno and Sparapano, 2006b). Moreover, a 60 kDa laccase isolated from Fmed secretome was shown to oxidize resveratrol, and four non-identified products (mass to charge ratios (m/z) of 471 $[M-H]^-$ and 499 $[M-H]^-$ for two of them) were detected by mass spectrometry (Abou-Mansour et al., 2009). Oxidation and polymerization of resveratrol into stilbenes dimers by *Botrytis cinerea* Pers., an Ascomycota and grapevine fruits pathogen, have been described (Cichewicz et al., 2000). Here should be noticed that stilbenes oligomers are usually associated with antifungal activities (Lambert et al., 2012; Stempien et al., 2017). Thus, dimerization was suggested to be a first step in fungal resveratrol metabolization (Cichewicz et al., 2000).

In this study, we aimed to investigate whether or not Fmed is better adapted to degrade grapevine wood compared to other wood species, possibly due to specific degradation or detoxification mechanisms. Tver, well studied for fungal wood degradation mechanisms, was used as a model. CO_2 production rate was measured during 3-month cultures of Fmed and Tver on grapevine cv. "Gewurztraminer," beech (*Fagus sylvatica*) or spruce (*Picea abies*) wood sawdust, to follow carbon mineralization continuously. Global mass loss and wood fiber chemistry (cellulose, hemicelluloses, lignin and soluble compounds contents), as well as targeted metabolomic (for primary metabolites and extractives) analysis were conducted to compare wood degradation upon substrates for the two WRF, and proteomic analysis at 1 and 3 months of culture aimed to correlate those observations with the fungal secretome. This constitutes a first step for a comprehensive approach of Fmed colonization mechanisms on wood.

Materials and methods

Fungal strains

Fomitiporia mediterranea (Fmed) strain phco36 was provided by Laboratoire Vigne Biotechnologies et Environnement (LVBE) of University of Haute-Alsace in Colmar and isolated from *Vitis vinifera* L. cv. 'Ugni blanc' in 1996 in Saint-Preuil (Charente, France). *Trametes versicolor* (Tver) strain BREM1218 was obtained from the Center International de Ressources Microbiennes (CIRM) catalog and isolated from *Quercus* sp. wood in France. All strains were cultivated and regularly regenerated on modified Pachlewski solid culture media (P25), composed of 20 g/l agar, 20 g/l glucose, 1.0 g/l potassium phosphate (KH_2PO_4), 0.5 g/l magnesium sulfate ($MgSO_4$), 3.0 g/l ammonium tartrate ($C_4H_4O_6 \cdot 2(NH_3)$), 5.0 g/l maltose, 0.4 g/l thiamine, 10 mg/l $MnCl_2$, 12 mg/l $FeSO_4$, 7 H_2O , 4.6 mg/l $ZnSO_4$, 7 H_2O , 1.2 mg/l $CuCl_2$, 17 mg/l H_3BO_3 , and 1.4 mg/l $NaMoO_4$, 2 H_2O .

Wood material

Mature trunks of *Vitis vinifera* cv. “Gewurztraminer” were cut in the Soultzmatt vineyard (Haut-Rhin, France) in February 2021 with the kind agreement of Valentin Zusslin Estate (Orschwihr, Haut-Rhin, France), and stored at room temperature before being sawn. Only white parts of the vine trunks, considered as healthy, were selected, sawn into 1 cm³ pieces and further reduced into sawdust by liquid-nitrogen assisted cold ball grinding (Cryomill®. Retsch GmbH). Bark, necrosis and black or brown parts were discarded during sawing. Beech (*Fagus sylvatica*) wood sawdust was provided by the BEF laboratory (Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers, INRAE) from Champenoux forest (Meurthe-et-Moselle, France). Spruce (*Picea abies* Karst) wood sawdust was provided by the NIBIO laboratory (Norwegian Institute of Bioeconomy Research) from Norwegian forest stands. All sawdusts were sifted between 0.5 and 2 mm and dried at 105°C before inoculations.

Fungal cultures on sawdust

The experimental plan is summarized in Figure 1. Wood sawdust was dried for 48 h at 105°C and 2.0 g per individual were added in 120 ml glass flasks and sterilized for 20 min at 120°C. To rich substrate moisture saturation, 5.0 ml of liquid modified P25 culture media, without carbon source (1.0 g/l KH₂PO₄, 0.5 g/l MgSO₄, 2.2 g/l ammonium sulfate [SO₄2(NH₄), 0.4 g/l thiamine, 10 mg/l MnCl₂, 12 mg/l FeSO₄, 7H₂O, 4.6 mg/l ZnSO₄, 7H₂O, 1.2 mg/l CuCl₂, 17 mg/l H₃BO₃, and 1.4 mg/l NaMoO₄, 2H₂O], were added under sterile conditions. One cm³ inoculum from 2-week-old fungal cultures grown on solid P25 media at 27°C was added to each flask. For control flasks, a similar amount of solid P25 media was added. Within 2 h after inoculation, three flasks of each test combination (9 combinations of wood (×3) and fungi (×2) or control, see Figure 1), further identified as time 0, were freeze-dried, lyophilized and ground into powder by liquid-nitrogen assisted cold ball grinding (Cryomill® Retsch GmbH) for methanolic extraction and wood fibers analyses. All other inoculated flasks were closed hermetically with septum caps and stored in the dark at 27°C until sampling (Figure 1). After 1, 2, and/or 3 months of culture (Figure 1), three flasks per test were freeze-dried and lyophilized for mass loss and ground into powder for methanolic extractions and wood fibers analyses. At 1 and 3 months for grapevine and beech sawdust cultures, three other flasks per test were extracted for proteomic analysis.

Measurement of carbon mineralization

Carbon mineralization was calculated by measuring the CO₂ pressure in each flask every 1–4 days. CO₂ content in each flask was measured in %v/v (%CO₂) with a Lambda CZ s.r.o. carbometer by flushing air contained in the flask with a KNF

Laboport® N86 kt.18 pump and sterile needles connected to silicone pipes through 0.2 μm filter. Oxygen pressure was renewed after each measurement at atmospheric pressure. %CO₂ was converted into CO₂ amount (nCO₂) in mol/L according to ideal gas law:

$$n\text{CO}_2 = \frac{P(\text{CO}_2) * V}{R * T}$$

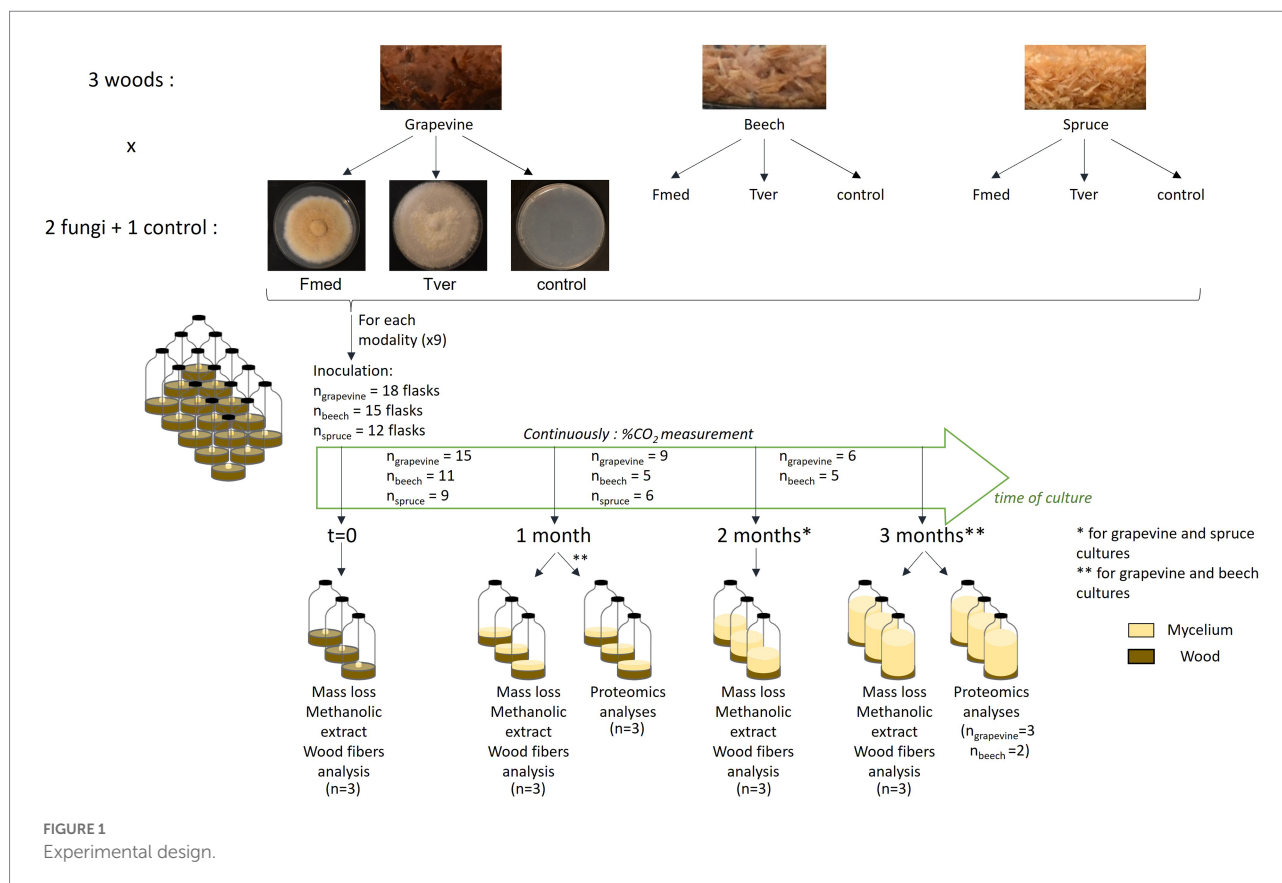
where P (CO₂) = %CO₂ multiplied by atmospheric pressure (101,325 Pa), V = 150 ml corresponding to the flask (120 ml) and pipes (30 ml) volume, R = 8,314 J mol⁻¹ K⁻¹ and T the temperature of the room in Kelvin during measurement. Finally, nCO₂ was converted in mass of mineralized carbon (mg C) in mg and the mineralization rate was calculated in mg C/day at each measurement point. Maximal mineralization rate corresponds to the mean of all highest mineralization rates (i.e., all rates which were not significantly different to the highest mineralization rate, according to Tukey test).

Mass loss

Global mass loss per flask was measured the difference between cultures dry weight after lyophilization and control mean dry weight and is expressed in percentages of control mean dry weight. Control samples dry weight at initial time and after each month of culture showed no difference. Statistical analysis was performed both between each mass loss and its respective control, and between each relevant mass losses with Student–Newman–Keuls test.

Wood fibers analyses

Wood fibers analyses were performed by ASIA platform (Université de Lorraine-INRAE; <https://a2f.univ-lorraine.fr/en/asia-2/>). Lignin, cellulose, hemicelluloses and soluble compounds contents were quantified in lyophilized ground samples using a protocol adapted from Van Soest and McQueen (1973). 0.4 g of each sample were dried at 105°C in porous and resistant bags (Fibrebag®, Gerhardt GmbH) and submitted to three successive baths to dissolve, respectively, soluble compounds, hemicelluloses and finally cellulose. Baths consisted, respectively, of (i) heated neutral detergent solution composed of: 30 g/l sodium dodecyl sulfate, 18.6 g/l sodium ethylene diamine tetra-acetate, 4.56 g/l sodium phosphate monobasic, 6.81 g/l sodium tetraborate decahydrate 10 ml/l and triethylene glycol, (ii) heated acidic detergent solution with 20 g/l of cetyltrimethylammonium bromure in 0.5 M sulfuric acid, and (iii) 72% sulfuric acid solution at room temperature. Samples dry weights before and after each bath were used to obtain each wood structure compound contents.



Methanolic extraction

As internal standard, $5 \text{ mg} \pm 0.1 \text{ mg}$ of lyophilized and powdered sample were extracted with $250 \mu\text{l}$ of LC-MS grade methanol previously supplemented with $5 \mu\text{g/ml}$ chloramphenicol (Sigma-Aldrich). The samples were sonicated in an ultrasonic bath (FB15050, Fisher Scientific, Hampton, United States) for 10 min and centrifugated at $12,000 \text{ g}$ for 15 min. The supernatant was analyzed using by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS).

Targeted metabolomic analysis

Metabolomic analyses were performed using a Dionex Ultimate 3,000 UHPLC system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States). Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) grade methanol and acetonitrile were purchased from Roth Sochiel (France); water was provided by a Millipore water purification system. The chromatographic separations were performed on a Nucleodur C18 HTec column ($150 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$, $1.8\text{-}\mu\text{m}$ particle size; Macherey-Nagel, Düren, Germany) maintained at 30°C . The mobile phase consisted of acetonitrile/formic acid (0.1%, v/v, eluant A) and water/formic acid (0.1%, v/v, eluant B) at a flow rate of 0.3 ml/min . The gradient

elution was programmed as follows: 0–1 min, 95% B; 1–6 min, 95–0% B; 6–8 min, 0% B. The sample volume injected was $1 \mu\text{l}$. The UHPLC system was coupled to an Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific), equipped with an electrospray ionization (ESI) source operating in positive and negative mode. Parameters were set at 350°C for the ion transfer capillary temperature and $2,500 \text{ V}$ for the needle voltages. Nebulization with nitrogen sheath gas and auxiliary gas was maintained at 40 and 5 arbitrary units, respectively. The spectra were acquired within the mass-to-charge ratio (m/z) ranging from 75 to 1,500 atomic mass unit, using a resolution of 50,000 at m/z 200 atomic mass unit. The system was calibrated internally in positive mode using dibutyl-phthalate as the lock mass at m/z 279.1591, giving a mass accuracy lower than 1 ppm. The instruments were controlled using the Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific). Metabolites were sought based on the calculated m/z of the corresponding pseudo-molecular ion $[M+H]^+$ in positive mode and $[M-H]^-$ in negative mode from a list of metabolites of interest using a suspect screening approach (Krauss et al., 2010; Flamini et al., 2013).

Putative metabolite identifications were proposed based on expertized analysis of the corresponding mass spectra and comparison with published literature. Further information was retrieved from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG1) and PubChem2 databases. The identification of some metabolites was confirmed with the corresponding standard for:

amino-acids (arginine, asparagine, glutamine, glutamate, aspartate, valine, proline, leucine, tyrosine, isoleucine, phenylalanine, tryptophane, and valine), phenolic acids (gallic acid and caffeic acid), flavonoids (catechin, epigallocatechin gallate, and naringenin) and stilbenoids (*trans*-resveratrol, pterostilbene, and ϵ -viniferin). All standards were provided by Sigma-Aldrich (France). Stilbene oligomers for which no standard was available were putatively identified as stilbene dimer M471, stilbene dimer M473, stilbene trimer M679, stilbene trimer M681, stilbene tetramer M907, where MXXX stands for the *m/z* of the corresponding ion in positive mode. Relative quantification of the selected metabolites was performed using the Xcalibur software.

Differential metabolomic analyses were performed after log₁₀ data transformation, using Tukey's honest significant difference method followed by false discovery rate (FDR) correction using the Benjamini-Hochberg procedure. Metabolites of interest were considered differentially accumulated when the false discovery rate was below 5% (FDR < 0.05).

Proteomic samples preparation

At 1 and 3 months of culture, for beech and grapevine cultures, extracellular proteins were extracted from three flasks per culture condition. Each flask was agitated with 30 ml of 30 mM potassium-acetate buffer at pH 4.5 for 2 h at 60 rpm at room temperature. Extracts were centrifuged 20 min at 4,000 rpm at 4°C and supernatants were precipitated overnight at -20°C in cold 80% acetone. Precipitated proteins were dried after centrifugation 20 min at 4,000 rpm at 4°C and diluted in 40 μ l of concentrated Laemmli blue (2-mercaptoethanol 24% (w/v), bromophenol blue 17.3 M, glycerol 20% (v/v), sodium dodecyl sulfate 10% (w/v) and Tris-base 0.4 M). Samples were heated for 10 minutes at 95°C and 15 μ l of each sample were deposited on 1 mm 15% SDS-PAGE gels for short-migration. Gels were revealed with Coomassie blue coloration and gel pieces were sent for proteomic analyses.

Proteomic analysis

Proteomic analyses were achieved by PAPPISO platform, INRAE, Jouy-en-Josas. The analyses of peptides were obtained using an UltiMate™ 3,000 RSLCnano System (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, United States) coupled to an Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribrid™ mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Samples were digested with trypsin and resuspended in 2% ACN and 0.1% TFA buffer. Four μ l were injected on an Acclaim PepMap C18 precolumn (5 μ m \times 300 μ m \times 5 mm) at 20 μ l/min and separated on an Acclaim PepMap RSLC nanoViper C18 column (2 μ m \times 75 μ m \times 500 mm, Thermo Fisher Scientific). Mobile phase was composed of A: 98% H₂O in 0.1% formic acid (HCOOH) and B: 80% ACN in 0.1% HCOOH. A gradient from

1.0% B during 2 min, to 30% B for 48 min and to 40% B for 5 min, followed by regeneration step at 98% B in 2 min for 5 min and equilibration at 1.0% B in 0.5 min for 4.5 min, was applied at 300 nl/min. Peptide ions were analysed using Xcalibur 4.1, Tune 3.0. with the following parameters: MS scan *m/z* 400–1,500 and resolution 120,000; MS/MS collision energy 30%, resolution 30,000, and dynamic exclusion set at 100 s. RAW data were converted to mzXML data with proteowizard software (Chambers et al., 2012). Proteins annotations was performed using the X!TandemPipeline (Langella et al., 2017) and <https://mycocosm.jgi.doe.gov/Fomme1/Fomme1.home.html>, <https://mycocosm.jgi.doe.gov/Trave1/Trave1.home.html> and an internal contaminants database. Only proteins with at least two distinct peptides were considered. Proteins relative abundancies were compared using protein abundance index (PAI) and exponentially modified protein abundance index (emPAI; Ishihama et al., 2005). Proteins with emPAI higher than 10 were selected for comparative analysis and were functionally annotated according to Joint Genome Institute (JGI) online database.

Statistical analyses

Data analysis and graphs were done using Rstudio, PBC software version 2022.02.3. Shapiro–Wilk test was used for data normality check when relevant. Kruskal–Wallis tests with Conover–Iman multiple comparisons test were used for nonparametric tests and Student Newman–Keuls (SNK-test) for parametric tests. All significant differences are indicated by *** for *p*-values < 0.001, ** for *p*-values < 0.005 and * for *p*-values < 0.05.

Results

Fmed and Tver were grown on sawdust from three different wood: grapevine cv. 'Gewurztraminer', beech, and spruce, during 3 months at 27°C in 120 ml flasks (Figure 2). Flasks were hermetically closed, and oxygen was renewed every 3–4 days. At each oxygen renewal, the amount of produced and accumulated CO₂ was measured, to follow fungal growth and wood degradation in a non-destructive way. Spruce sawdust cultures were stopped after 2 months because no more carbon mineralization was measured before the end of the 2-months spruce cultures. As shown in Figure 1, for each test condition, at least 12 replicates or flasks were inoculated at the same time. Among them, three replicates were sampled at time 0, 1 month, 2 months (for spruce and grapevine) and 3 months (for grapevine and beech) for mass loss, methanolic extraction (for metabolomic analyses) and wood fibers analyses. Three other replicates were sampled at 1 and 3 months of culture for proteomic analyses, for grapevine and beech only as only low carbon mineralization and no mass loss were observed on spruce.

Morphological observations

Both Fmed and Tver showed distinct morphologies, as shown in Figure 2. On grapevine and beech sawdust, Fmed had the same morphology: white mycelium at the beginning, turning yellow while colonizing the whole volume of the flask. On the contrary, the Tver mycelium remains white and at the bottom of the flask, on the sawdust. On spruce sawdust, a light and white mycelium was observed with Fmed, as well as a slight change in sawdust color (darkening). No mycelium was observed in the spruce Tver culture. A light white fruiting bodies were observed in any of the cultures.

Carbon mineralization rate

Carbon mineralization rates were obtained by measuring the CO₂ content (%v/v) and expressed in mgC/day (Figure 3A). CO₂ content was renewed to atmospheric content after each measurement. Carbon mineralization rates of Fmed cultures differed depending on the substrate. On grapevine, a rapid increase was observed (before day 15th), followed by a stabilization until the end of the culture (84 days). On beech sawdust, three phases of the mineralization rate were observed: an increase (before day 22nd), a stabilization and a decrease (after day 63rd). Increase phase was longer (or slower) compared to that observed on grapevine. On spruce sawdust, the Fmed mineralization rate increased before day 22nd and decreased after day 36th.

The maximal mineralization rate corresponds to the mean mineralization rate during the stabilization phase. For the latter, no differences were observed between Fmed grapevine or beech cultures (2.55 and 2.46 mgC/day respectively). A lower maximal mineralization rate was observed for Fmed spruce culture (1.27 mgC/day).

In Tver cultures, with the three substrates, three phases of the mineralization rate were successively observed: an increase, a stabilization and a decrease (Figure 3B). On grapevine and spruce,

the increase phase occurred before day 7th whereas it occurred before day 22nd on beech. On grapevine and beech, the decrease phase started after 43 incubation days while it started after 15 incubation days on spruce. Contrary to Fmed cultures, a higher maximal respiration rate was observed in Tver beech culture than in Tver grapevine culture. For both substrates, this rate was significantly higher compared to Fmed cultures (p -values < 0.001). Tver and Fmed maximal mineralization rates were similar on spruce.

Mass loss

Global mass loss was obtained from cultures total dry weight at 0, 1, 2 or 3 months of culture (Figure 4). After 1 month of fungal exposure to Fmed, no significant mass loss was observed for any of the three sawdust. After 2 months, Fmed culture on spruce caused no significant mass loss, whereas 15.7% of mass loss was observed on grapevine. After 3 months, a higher mass loss (23.6%) on grapevine than on beech (13.8%) was observed. Thus, consistently with mineralization rates, Fmed did not significantly degrade spruce wood and degraded more grapevine wood than beech wood.

After 1 and 2 months of incubation in the presence of Tver, mass losses measured in grapevine wood cultures (13.3 and 19.0% respectively) were higher than with Fmed. As for Fmed cultures, no significant mass losses were observed on spruce after 2 months of exposure to Tver. Unlike the two first months, a similar degradation was observed with both fungi after 3 months of grapevine culture (21.7% with Tver). A similar mass loss was observed on beech cultures after 3 months of exposure to Tver (20.3%). Thus, after 3 months, Fmed and Tver degraded an equivalent amount of grapevine wood and Fmed degraded less beech wood than Tver.

Wood fibers analyses

Soluble compounds, hemicelluloses, cellulose, and lignin contents were obtained at 0, 1, 2 and/or 3 months of each culture

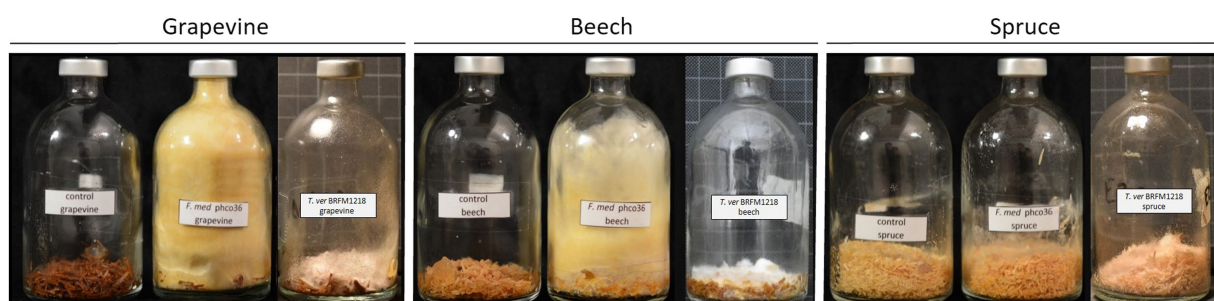


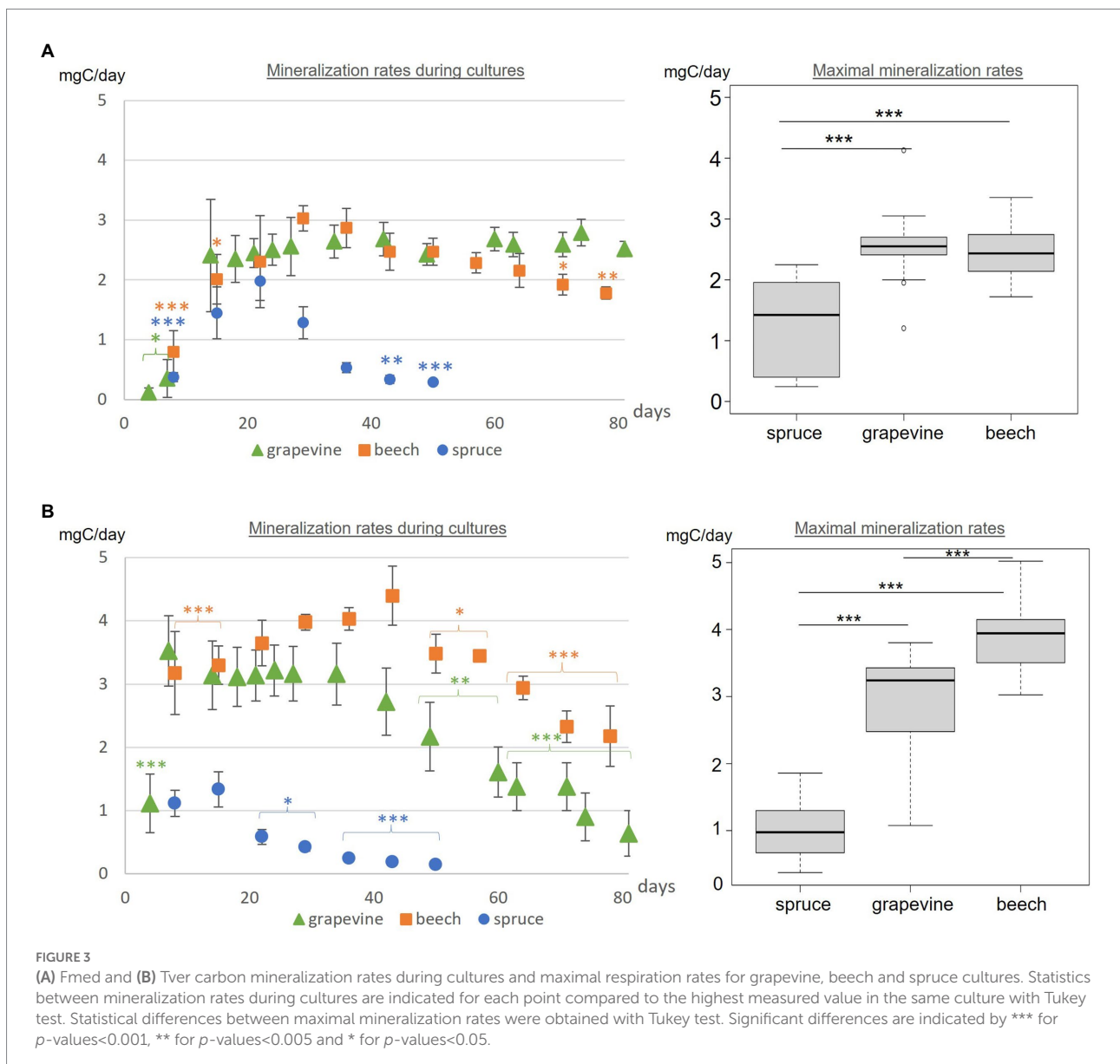
FIGURE 2
Control, Fmed (*F. mediterranea* phco36) and Tver (*T. versicolor* BRFM1218) cultures on grapevine, beech and spruce at the end of the cultures. Grapevine and beech cultures were stopped at 3 months, and spruce cultures were stopped at 2 months. A yellow and woolly mycelium was observed for Fmed whereas Tver mycelium remains white and at the bottom of the flask. On spruce, a slight coloration of sawdust and white mycelium are observed with Fmed, and no mycelium is observed with Tver.

according to Van Soest method (Van Soest and McQueen, 1973). Composition of control wood sawdust was the same at each month of culture, including time 0. Mean composition of control sawdust and sawdust exposed to fungal culture during 2 or 3 months are shown in Figure 5A for grapevine, Figure 5B for spruce and Figure 5C for beech. Grapevine initially contained more lignin (19%) than beech (13%) and less than spruce (25%); less hemicelluloses (28%) than beech (31%) and more than spruce (19%); less cellulose (35%) than both beech (46%) and spruce (43%); and the highest soluble compounds content (18%) compared to beech (10%) and spruce (13%). After 2 and 3 months of fungal exposure to both Fmed and Tver, no significant variations regarding cellulose, hemicelluloses and lignin were observed for all substrates. Concomitantly, after 3 months of fungal culture, soluble compounds content increased in beech sawdust exposed to Fmed and to Tver (+6%). In grapevine

sawdust exposed to Fmed during 2- and 3-months, this content remained equivalent, whereas it decreased after 3 months exposed to Tver (−3%).

Targeted metabolomic analysis

Fourteen stilbenes and four flavonoids were detected with grapevine cultures (Figure 6A), three flavonoids with beech cultures, and no wood extractives on spruce cultures (Figure 6C), whereas in total twelve amino acids (AA) and five other phenolic compounds were differentially detected (Figure 6). Stilbene oligomers, for which no standards were available, were putatively identified as stilbene dimers, trimers and tetramers as indicated. Heatmaps of relative mean peak areas of detected metabolites for each wood are given in Supplementary Figure S1. The latter shows



that no time effect was observed, as no quantitative variations were observed between 0-, 1-, 2-, and 3-months control cultures.

Significant variations in the relative amounts of the selected metabolites were observed between the control and the culture in a time-dependant manner, as shown in Figure 6. During Fmed grapevine and beech cultures, the content of all selected flavonoids and stilbenes decreased. Epigallocatechin gallate, catechin, *trans*- and *cis*-resveratrol, *trans*- and *cis*-piceid, *trans*-piceatannol, pterostilbene and two stilbene dimers (M471 and M473) contents decreased from the first month of culture. Relative amount of naringenin, *cis*-piceatannol, ϵ -viniferin, one stilbene trimer and one stilbene tetramer (M681 and M907) decreased from 2 months of culture, and one stilbene trimer (M679) content decreased after 3 months of culture. Epicatechin content decreased at 1 month and reverted to control value at 2 and 3 months. A very slight natural degradation of this compound in control samples (Supplementary Figure S1), or an increase of epicatechin content during the second month in presence of Fmed. In beech cultures, catechin, epicatechin and naringenin contents also decreased after the first month of culture. Thus, most of the selected extractives were degraded by Fmed after different culture times.

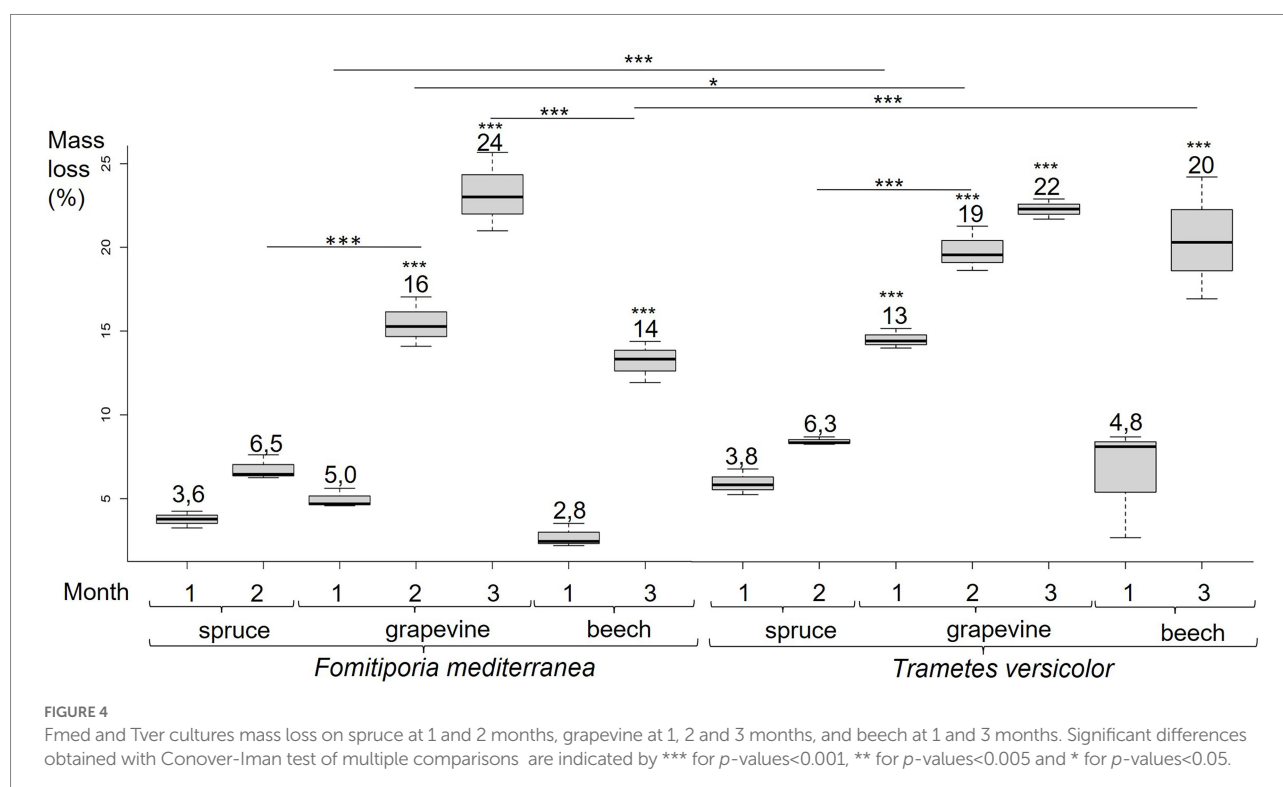
Not all extractive contents in Tver grapevine culture decreased to the same extent, some of them decreasing less intensely or slower than in Fmed culture. Three stilbenes, *cis*-piceatannol and the two stilbene trimers (M679 and M681), were not degraded. All other grapevine extractives, except catechin, epicatechin, *cis*-piceid and *trans*-piceatannol were less or more slowly degraded compared to Fmed cultures.

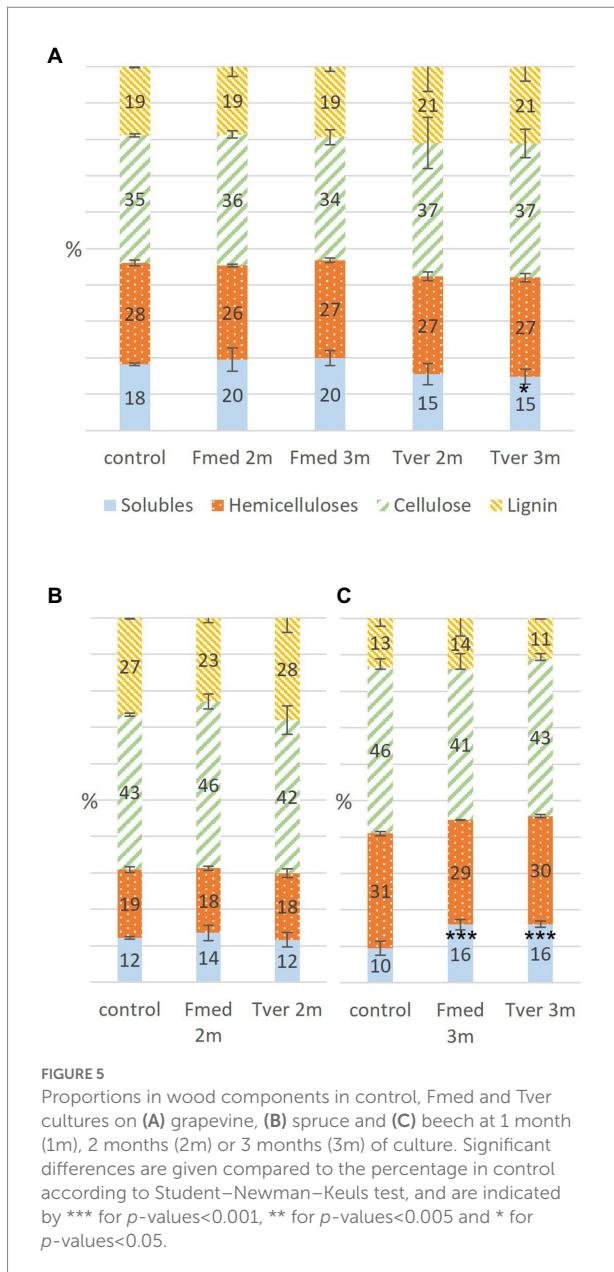
Besides extractives, primary metabolites contents in Fmed cultures evolved differentially depending on the wood species. With grapevine, an increase in eight AA levels was observed (isoleucine, aspartate, glutamate and glutamine after 1 month and leucine, tyrosine, phenylalanine and tryptophane after 2 months). In beech and in spruce cultures, only three of them (glutamine, glutamic acid, and aspartate) increased. Proline and arginine levels decreased in grapevine cultures after 1 and 3 months, respectively. Interestingly, in spruce cultures an increase of arginine and proline content was observed.

When growing Tver on grapevine sawdust, differences between fungal cultures and control have been observed for only three AA: glutamine level increased after 1 month, proline level decreased after 2 months, and valine level decreased after 1 month. Valine level decreased in beech cultures exposed to Tver for 1 month, and not when exposed to Fmed. AA levels variations were similar in beech and spruce cultures exposed to both Fmed and Tver.

Proteomic analysis

Proteomic analyses were conducted on 1- and 3-months grapevine and beech cultures of Fmed and Tver. Proteins with emPAI above 10 in at least one experimental condition were selected for comparative analysis. Thus, respectively 113 and 122 proteins were compared in Fmed and Tver secretomes (Table 1). As expected, mainly extracellular proteins were detected, except for two P450s in Fmed cultures (Supplementary Table S1). As





shown in Table 1, a similar amount of secreted proteins were found in Fmed grapevine (101 proteins) and beech cultures (93 proteins). MnPs were the only class-II peroxidases detected. Among the 16 MnPs identified in Fmed genome (Floudas et al., 2012), 11 were found on grapevine wood whereas eight were found on beech. Three and two laccases were found on the two substrates, respectively, among the ten identified in the Fmed genome (Floudas et al., 2012). Few differences regarding the number of CAZyS detected in the Fmed secretome on grapevine or beech were observed (50 on grapevine and 49 on beech). Also, more peptidases were found with grapevine wood (18) compared to beech wood (11). Relative abundances for secreted proteins in Fmed and Tver grapevine and beech cultures are shown in Figure 7. More oxidoreductases were found with grapevine (33%) rather than with beech (18%). Among them, mainly MnPs were

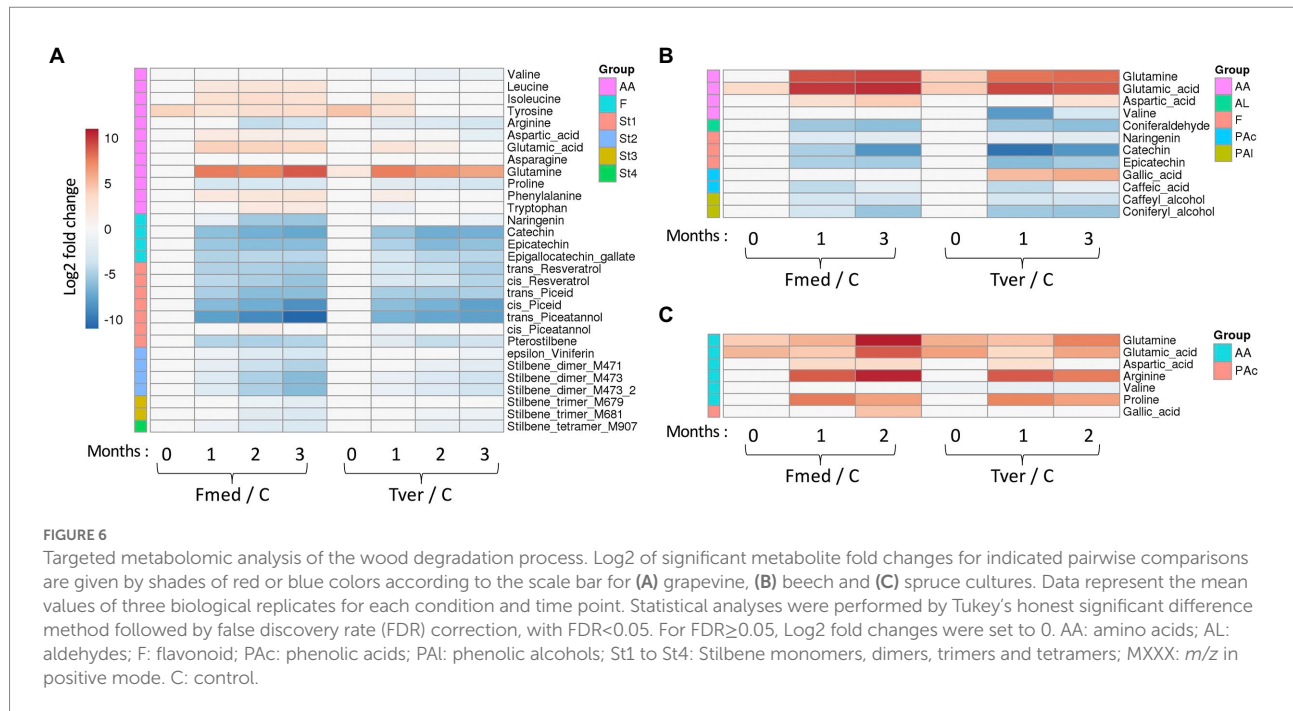
found (respectively 24 and 13% of total proteins content). More laccases were found with grapevine (7%) than with beech (1%). Protease abundance was also higher with grapevine (14%) than with beech (10%). Thus, more MnPs, laccases and peptidases were observed in the Fmed secretome on grapevine compared to beech sawdust, both regarding protein diversity and abundance. Total numbers and abundances of CAZyS were similar between the two substrates, and few differences in CAZyS composition were observed (Supplementary Table S1).

In the Tver genome, eight LiPs and six MnPs were identified, among, respectively, 10 and 13 identified in the Tver genome (Floudas et al., 2012), whereas no VPs nor GPs were detected either on grapevine or on beech (Table 1). On grapevine and on beech, eight and seven LiPs and five and three MnPs, respectively, were identified in the Tver secretome. Four laccases on the seven identified in the Tver genome (Floudas et al., 2012) were found on grapevine and one on beech. However, as shown in Figure 7, oxidoreductases were less abundant on grapevine than on beech. Moreover, contrary to the Fmed secretome (Supplementary Figure S2A), CAZyS abundances in Tver secretome showed substrate specificities for some of these proteins (Supplementary Figure S2B). Indeed, for the latter, proteins from GH15 and GH43 families were detected with higher relative abundances on grapevine compared to beech cultures. One alpha-amylase from GH13 family subfamily 32, one GH17 and one glucosidase from GH31 family were more represented on grapevine than on beech cultures. On the contrary in the Fmed secretome, GHs from those families were either not found (no GH13 identified) or found on both grapevine and beech. Some GH families were identified only in Fmed or in Tver secretome (Supplementary Table S2), such as GH1 or GH18 only detected in Fmed secretome.

Discussion

Important mechanisms involved in Fmed wood degradation and detoxification were described. A simultaneous degradation pattern, i.e., the concomitant degradation of all wood structure components, was observed with the two hardwood species, while no significant mass loss was observed with spruce. In parallel, specificities of Fmed mechanisms on grapevine wood were highlighted, namely regarding carbon mineralization rate, mass loss, metabolomic analyses and secreted proteins analyses.

Wood initial compositions of the three substrates were different: grapevine showed low cellulose contents and high soluble compounds contents. Its lignin content was lower compared to spruce and higher compared to beech. A decrease of soluble compounds was observed in grapevine cultures while their content increased in beech cultures. Soluble compounds include extractives and other non-structural wood compounds, such as soluble nutrients, sugars or nitrogen reserves. Degradation or consumption of the latter could lead to soluble compounds decrease, whereas accumulation of fungal wood degradation products or soluble compounds from mycelium could lead to an



increase. Further experiments such as more precise determination of the nature of soluble compounds would give more information about fungal growth mechanisms. In parallel, the absence of variations in proportions of the three main structural components suggests a simultaneous WRF degradation pattern (Blanchette et al., 1985). This was observed on both grapevine and beech wood. This is consistent with one previous study based on wood fibers analysis (Pacetti et al., 2022). Initial lignin and soluble contents in grapevine wood (respectively, 19 and 18%) are higher than previously reported for the same cv. (15.7 and 14.6%), while measured hemicelluloses content is lower than previously reported (respectively, 28 and 35.7%; Pacetti et al., 2022). In another study with grapevine cv. Sangiovese, higher lignin and lower hemicellulose contents were observed in brown streaking wood (17.2%) and brown red wood (29.9%) compared to asymptomatic wood (12.1%; Agrelli et al., 2009). Previous fungal degradation, for example by the two Ascomycota *P. chlamydospora* and *P. minimum* associated with brown necrosis, could explain a higher lignin content (Agrelli et al., 2009). Several other parameters could affect lignin content in wood, such as environmental stresses (Blanchette, 1991). For this study, only white parts of wood, considered as healthy, were selected. Fmed ability to degrade healthy grapevine wood is consistent with previous studies showing that the latter does not require previous degradation, namely by the two Esca-associated Ascomycota *P. chlamydospora* and *P. minimum* (Sparapano et al., 2001; Brown et al., 2020). However, among other factors, different structural compositions were shown to induce different fungal wood degradation patterns (Blanchette, 1991). For example the WRF *Pleurotus ostreatus* shows simultaneous degradation with beech and lignin preferential degradation with oak wood (Bari et al.,

2020). Our results show simultaneous degradation pattern on beech and grapevine wood for both Fmed and Tver. This is consistent with *in vitro* and *in vivo* studies showing a simultaneous degradation for Tver on beech, spruce, oak or hornbeam (Karim et al., 2017; Bari et al., 2020). Fmed wood degradation patterns might be different with other substrates, such as other wood species or previously degraded wood, or in different growth conditions. Fmed was identified on different wood species, such as *Actinidia* sp., *Citrus* sp. or olive trees (Moretti et al., 2021) and strains specificities were shown for Fmed depending on the wood species from which they were isolated (Markakis et al., 2017). Thus, wood degradation pattern might be more specific upon other wood species and investigation with more Fmed strains and more wood species could highlight more Fmed specificities.

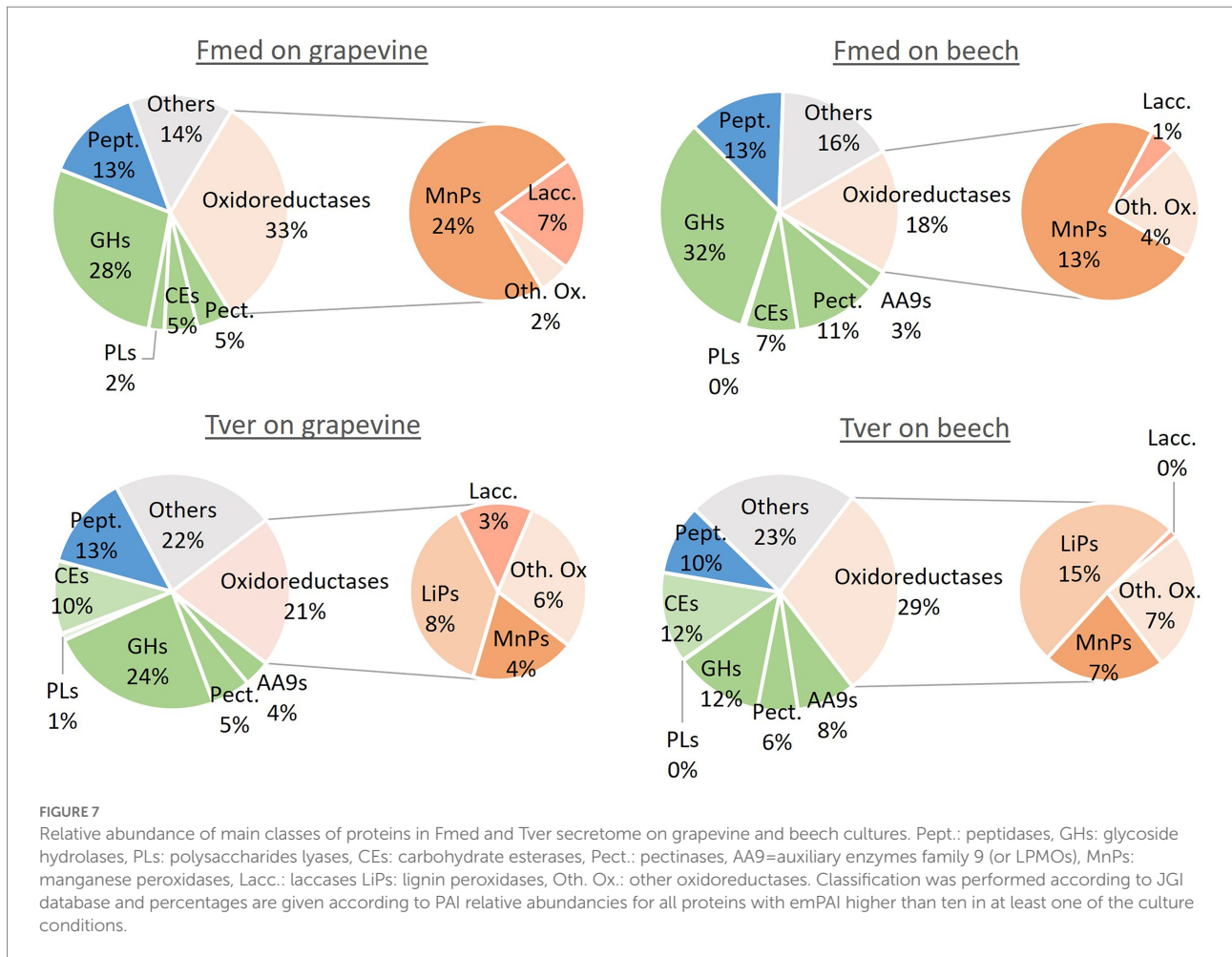
Contrary to wood degradation pattern, other parameters suggest a specific activity for Fmed on grapevine cultures compared to the other substrates: a longer stabilization phase for maximal mineralization rate, a higher mineralization rate (compared to spruce only), higher mass loss, more secreted laccases and MnPs and elevated AA levels. Indeed, carbon mineralization rate on grapevine cultures reached a plateau and maintained it until the end of the 3-month cultures. On the contrary with beech and spruce cultures, mineralization rates decreased before the end of the cultures. CO₂ production or carbon mineralization results from metabolic processes including fungal respiration. With wood as the only carbon source, carbon mineralization rate can be considered as an indicator of wood degradation. The first increase of carbon mineralization rate followed by a plateau was already observed in fungal cultures with 18 white or brown rot species isolated from forest softwoods with different microclimatic preferences (Carlsson et al., 2017). The

TABLE 1 Number of detected proteins functionally classified in Fmed and Tver secretomes on grapevine and beech wood sawdust in 1- and 3-months cultures.

Protein families	Fmed								Tver								
	Genome ¹	All	Grapevine wood			Beech wood			Genome ¹	All	Grapevine wood			Beech wood			
			All	1 month	3 months	All	1 month	3 months			All	1 month	3 months	All	1 month	3 months	
Oxidoreductases																	
MnP	16	11	11	10	7	8	8	4	13	6	5	5	0	3	2	2	
LiP	0	0	0	0	0	0	0	0	10	8	8	8	1	7	7	0	
VP	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	
GP	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Total Class II-POD	17	11	11	10	7	8	8	4	26	14	13	13	1	10	9	2	
DyP	3	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	1	1	1	1	1	
HTP	4	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	
Laccases " <i>sensu stricto</i> "	10	3	3	3	2	2	2	0	7	4	3	3	1	1	0	1	
Ferroxidases	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	
Ferroxidase/laccase	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
Glyoxal oxidase	0	1	1	0	1	1	0	1	5	4	2	1	2	4	4	4	
Copper radical oxidase	4	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	
CDH	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	
Other GMC oxidase	4	4	1	1	1	4	4	3	9	0	0	0	0	0	0	0	
Total oxidoreductase	44	19	16	14	11	15	14	8	60	24	20	19	5	16	14	8	
CAZyS																	
GH	50	43	40	21	38	38	27	33	47	45	42	35	36	34	30	30	
AA9	13	2	2	2	2	2	2	2	18	5	4	4	1	3	3	3	
CE	12	8	7	3	6	8	7	8	14	8	6	5	6	8	5	8	
PL	?	1	1	1	1	1	1	0	?	1	1	0	1	0	0	0	
Total CAZY	75	54	50	28	47	49	37	43	79	59	53	44	44	45	38	41	
incl. CBM	?	8	8	6	7	7	5	5	?	13	11	11	10	11	9	10	
Others																	
Peptidases/proteases	–	18	15	10	14	11	7	11	–	14	12	10	9	8	8	6	
Others or unknown	–	22	20	7	18	18	13	16	–	25	20	14	14	16	8	16	
TOTAL	–	113	101	58	90	93	71	78	–	122	105	87	72	85	68	71	

¹Genomic data were found in Floudas et al. (2012).

Proteins for which emPAI relative abundance was higher than ten in at least one of the culture conditions were selected. MnP: manganese peroxidase, LiP: lignin peroxidase, VP: versatile peroxidase, GP: generic peroxidase, Class-II-POD: class-II peroxidase, DyP: dye-decolorizing peroxidase, HTP: heme-thiolate peroxidase, CDH: cellobiose dehydrogenase, GMC: glucose-methanol-choline oxidoreductase, GH: glycoside hydrolase, AA9: auxiliary enzyme family 9 (syn. LPMO: lytic polysaccharide monoxygenase), CE: carbohydrate esterase, PL: polysaccharides lyase, CAZY: carbohydrate active enzyme, incl. CBM: including cellulose binding module.



authors suggested that fungi first grow exponentially while colonizing the whole substrate, and then reach a substrate-species equilibrium. Thus, a longer equilibrium phase suggests a better fungal growth on this substrate. Moreover, the speed of colonization phase and the maximal mineralization rate are specific to fungal species, and can be related to different fungal colonization strategies (Boddy and Heilmann-Clausen, 2008; Carlsson et al., 2017). Here should be noticed that respiration might not only result from wood degradation but also from fungal storage compounds metabolism or self-recycling processes (Hiscox et al., 2015). Moreover, MnPs activities were also shown to produce CO₂ (Hofrichter et al., 1999). Thus, carbon mineralization rates are not only related to fungal growth but also to fungal metabolic activity. The latter is higher for Fmed with the two hardwoods species compared to spruce wood, and a longer equilibrium phase is observed with grapevine wood compared to beech.

As suggested by carbon mineralization rate, higher mass loss on grapevine cultures compared to beech and spruce confirm a higher wood degradation rate for Fmed on grapevine. This degradation rate is higher than the one reported by a previous study (10% after 3-months) using the same fungal strain and grapevine

cv. (Pacetti et al., 2022). In the latter study grapevine wood blocks (0.5×5×2.5 cm) were used and, among other parameters, the three-dimensional structure of wood initial wood composition might have limited fungal access to wood polymers (Blanchette, 1991). On spruce wood, mass losses are lower than on the two hardwoods for both fungi. Thus, spruce wood appears as more recalcitrant to fungal degradation, which is consistent with previous studies (Bari et al., 2020). This can be explained by the higher lignin content observed in spruce, or by softwood lignin composition mainly containing guaiacyl units (Blanchette et al., 1988). Wood degradation rates between beech and grapevine for Tver cultures were similar, contrary to Fmed cultures suggesting that this latter is less efficient to degrade beech wood than grapevine wood. This could be at least partially explained by the nature of Class-II PODs secreted by the two fungi. Indeed, consistently with genomic data (Floudas et al., 2012), MnPs were the only class-II PODs detected in the Fmed secretome, whereas both LiPs and MnPs were detected in the Tver secretome. Moreover, more MnPs and laccases were secreted by Fmed on grapevine than on beech. Enhancement of MnPs and laccases gene expression in mycelium exposed to wood compared to control cultures were previously described (Pacetti et al., 2022). The highest wood degradation rate with Tver on beech

cultures compared to Fmed could be related to LiPs capacity to degrade non-aromatic parts of lignin, additionally to aromatic parts, contrary to MnPs (Wong, 2009). Our results show a positive correlation between wood degradation rate by Fmed and MnPs relative abundancies. This observation is consistent with the role of those enzymes in wood degradation. However, this is not the case in Tver cultures. A similar degradation rate with both substrates by Tver is associated with more oxidoreductases on beech than on grapevine, suggesting a more important role of CAZyS in grapevine wood degradation by Tver. Higher abundancies of some GHs families, such as GH15 or GH43, could be involved in specific degradation. Indeed, specific carbohydrate degradation activities upon the woody substrate were shown for the white-rot species *Dichomitus squalens*: a higher xylanolytic activity on hardwood (birch) than on softwood (spruce), which are containing, respectively, more xylan and more mannan (Daly et al., 2018). Xylose was reported as the main sugar found in hemicelluloses of grapevine pruning wood (Nitsos et al., 2016), suggesting a majority of xylan and/or xyloglucan. This is also the case for beech wood, consistently with common hardwood hemicellulose composition (Laine, 2014; Ibrahim and Kruse, 2020). On the contrary, no clear differences were observed between the two substrates for CAZyS composition in Fmed secretome upon the substrate. Thus, Fmed modulates its oxidoreductases secretion upon its substrate but not the nature of GHs. Changes in secretome linked to environmental factors have been well described, although regulation mechanisms remain not fully understood (McCotter et al., 2016). Several factors such as hemicellulose or lignin composition, pH or wood extractives might have induced changes in the two WRF secretomes. Tver secretome modulations were associated to similar wood degradation rates, whereas Fmed degraded grapevine wood more efficiently than beech wood. Thus, Fmed might be more specifically adapted to grapevine wood compared to other wood species.

Targeted metabolomic analysis aimed at following wood extractives during exposure to Fmed or Tver and eventually highlighting fungal metabolic activity through primary metabolite detection. All selected extractives, stilbenes and flavonoids in grapevine wood and flavonoids in beech wood, decreased during Fmed cultures. Stilbenes are known for their biological activities and for their accumulation in grapevine wood in response to a pathogen attack (Galarneau et al., 2021). Their presence and levels in wood depend on several factors, including grapevine cultivar (Gabaston et al., 2019). Gewurztraminer and Pinot noir were reported as particularly rich in stilbenes compared to other cultivars, with total stilbenes content ranging from 4,628 to 5,830 mg/kg DW (Vergara et al., 2012; Lambert et al., 2013; Guerrero, 2016). In our wood material ϵ -viniferin, the most abundant, *trans*-resveratrol and piceatannol were identified, which is in accordance with the reported stilbene composition of *cv.* Gewurztraminer (Vergara et al., 2012; Lambert et al., 2013; Guerrero, 2016). Six grapevine stilbenes (resveratrol, pterostilbene, miyabenol C, vitisin A and B and isohopeaphenol) were shown to partially inhibit Fmed growth (Bruno and

Sparapano, 2006b; Lambert et al., 2012). Fmed resveratrol detoxification activity was demonstrated *in vitro* (Bruno and Sparapano, 2006b), and the decrease of resveratrol content in Fmed cultures is consistent with this observation. More efficient detoxification processes might enhance wood degradation. Indeed, grapevine extractives were degraded faster and to a higher extent in presence of Fmed than of Tver. Interestingly, more laccases were detected in Fmed secretome in 1-month cultures compared to 3-months cultures. In addition, almost all extractives were already degraded in 1-month cultures. This is consistent with known potential detoxification activities of laccases (Jönsson et al., 1998; Lekounougou et al., 2008; Valette et al., 2017). Our results suggest a fungal-substrate adaptation, as several extractive contents in grapevine wood (*cis*-piceatannol, stilbene dimers, trimers and tetramer, including ϵ -viniferin, and naringenin) decreased faster and to lower levels in Fmed cultures compared to Tver cultures, and the opposite was observed for catechin in beech cultures.

Variations of amino acids levels have been observed depending on the used fungus and substrate. AA are found as nitrogen reserves in grapevine, and arginine was reported as the most represented (Zapata et al., 2004). In grapevine cultures exposed to Fmed or to Tver, arginine and proline levels decreases might be due to fungal degradation or metabolization. In previous studies AA levels variations during grapevine-fungi interactions were attributed to grapevine reaction, as experiments were conducted on living wood (Labois et al., 2021). In our conditions, they can be rather attributed to fungal metabolic activity. AA are essential for various fungal metabolic pathways, and their levels increase is consistent with the presence of proteases observed in both Fmed and Tver secretomes. They might be due to degradation products from wood proteins or to fungal autolysis processes. Differences observed in the nature and the levels variations of AA, depending on the cultures, suggest fungal-substrate specific activities.

To conclude, Fmed was able to degrade two hardwood species namely grapevine, a liana on which it is involved in wood disease, and beech, a forest tree. Simultaneous degradation patterns were observed on both substrates, like a majority of WRF including Tver, the comparison model used in this study. Fmed specific traits on grapevine were highlighted: a higher degradation rate than with beech, more laccases and MnPs secreted, and a more efficient extractive detoxification compared to beech and compared to Tver. Thus, Fmed wood degradation mechanisms seem to be more adapted to grapevine wood than to other woods such as beech or spruce. However, the ubiquitous WRF Tver was able to modulate its secretome and to degrade grapevine wood as efficiently as Fmed, although it has never been observed on this species. Thus, beside its ability to degrade grapevine wood, the widespread of Fmed in vineyards may rely on other factors. For example, adaptation to higher extractive contents in living grapevine wood, or to other biotic and abiotic factors might also be relevant to explain the growing importance of Fmed in vineyards.

Data availability statement

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (Perez-Riverol et al., 2022) partner repository with the dataset identifier PXD036889.

Author contributions

EG, SF, CB, and MS contributed to conception and design of the study. MS (all data), ER (wood fibers data), AM-G, and RB (metabolomic data) contributed to obtain the experimental data. MS and EG (all data), ER (wood fibers data), AM-G, and RB and PH (metabolomic analysis) contributed to data analyses. MS wrote the first draft of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

UMR IAM is supported by the French Agency through the Laboratory of Excellence Arbre (ANR-11-LABX-0002-01), the region Grand Est and the Fonds Européen de Développement Régional (project VitEST). This work benefited from the ASIA platform (Université de Lorraine-INRAE; <https://a2f.univ-lorraine.fr/en/asia-2/>). Proteomics analyses were performed on the PAPPSO platform (<http://pappso.inra.fr>) which is supported by INRAE (<http://www.inrae.fr>), the Ile-de-France regional council (<https://www.iledefrance.fr/education-recherche>), IBiSA (<https://www.ibisa.net>) and CNRS (<http://www.cnrs.fr>).

Acknowledgments

The authors would like to thank Francis Groff and the Valentin Zusslin Estate for providing grapevine wood, Gry Alfredsen (NIBIO) for spruce sawdust, Bernd Zeller from (BEF, INRAE) for beech sawdust. All authors are grateful to Jean-Pierre Jacquot for constructive criticism of the manuscript. The authors specially thank Céline Henry (PAPPSO platform) for the proteomic analyses and data deposit.

References

- Abou-Mansour, E., Polier, J., Pezet, R., and Tabacchi, R. (2009). Purification and partial characterisation of a 60 kDa laccase from. *Phytopathol. Mediterr.* 48, 447–453.
- AFMB, Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques UMR7257-CNRS - Université d'Aix-Marseille (2022a). Carbohydrate Esterase Family Classification. *CAZy.org*. Available at: <http://www.cazy.org/Carbohydrate-Esterases.html> (Accessed May 7, 2022).
- AFMB, Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques UMR7257-CNRS - Université d'Aix-Marseille (2022b). Glycoside Hydrolase Family Classification. *CAZy.org*. Available at: <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html> (Accessed May 7, 2022).
- Agrelli, D., Amalfitano, C., Conte, P., and Mugnai, L. (2009). Chemical and spectroscopic characteristics of the wood of *Vitis vinifera* cv. Sangiovese affected by esca disease. *J. Agric. Food Chem.* 57, 11469–11475. doi: 10.1021/jf903561x

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.988709/full#supplementary-material>

SUPPLEMENTARY FIGURE S1

Heatmap of global metabolite profiles during the wood degradation process. Log10 mean peak area of the indicated metabolites are given by shades of red, yellow, or blue colors according to the scale bar for (A) grapevine, (B) beech and (C) spruce cultures. Data represent the mean values of three biological replicates for each condition and time point. AA: amino acids; AL: aldehydes; F: flavonoid; PAC: phenolic acids; PAL: phenolic alcohols; St1–St4: Stilbene monomers, dimers, trimers and tetramers; MXXX: *m/z* in positive mode. C: control.

SUPPLEMENTARY FIGURE S2

Relative abundance expressed as emPAI for all selected glycoside hydrolases in (A) Fmed and (B) Tver secretome on grapevine and beech 1- and 3-month cultures. Proteins for which emPAI relative abundance was higher than ten in at least one of the culture conditions were selected. RA: relative abundance.

SUPPLEMENTARY TABLE S1

Relative abundancies expressed as emPAI for selected proteins in Fmed and Tver secretome on grapevine and beech cultures. The grouping of proteins into protein subgroups was done using the grouping algorithm included in X!TandemPipeline (Langella et al., 2017). Only proteins for which emPAI relative abundance was higher than ten in at least one of the culture conditions were selected. Bulks are mix from all samples and were used as quality control during batch analysis. Protein IDs, annotations and classification are given according to JGI and Gene Ontology (GO) databases.

- Bari, E., Daniel, G., Yilgor, N., Kim, J. S., Tajick-Ghanbary, M. A., Singh, A. P., et al. (2020). Comparison of the decay behavior of two white-rot fungi in relation to wood type and exposure conditions. *Microorganisms* 8:1931. doi: 10.3390/microorganisms8121931

- Bertsch, C., Ramírez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E., et al. (2013). Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood: *grapevine trunk diseases*. *Plant Pathol.* 62, 243–265. doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02674.x

- Blanchette, R. A. (1991). Delignification by wood-decay fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29, 381–403. doi: 10.1146/annurev.py.29.090191.002121

- Blanchette, R. A., Abad, A. R., Farrell, R. L., and Leathers, T. D. (1989). Detection of lignin peroxidase and xylanase by immunocytochemical labeling in wood decayed by Basidiomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1457–1465. doi: 10.1128/aem.55.6.1457-1465.1989

- Blanchette, R. A., Obst, J. R., Hedges, J. I., and Weliky, K. (1988). Resistance of hardwood vessels to degradation by white rot Basidiomycetes. *Can. J. Bot.* 66, 1841–1847. doi: 10.1139/b88-251
- Blanchette, R. A., Otjen, L., Effland, M. J., and Eslyn, W. E. (1985). Changes in structural and chemical components of wood delignified by fungi. *Wood Sci. Technol.* 19, 35–46. doi: 10.1007/BF00354751
- Boddy, L., and Heilmann-Clausen, J. (2008). “Basidiomycete community development in temperate angiosperm wood,” in *Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes British Mycological Society Symposia Series*. eds. L. Boddy, J. C. Frankland and P. van West (Netherlands: Academic Press, Elsevier), 211–237.
- Brown, A. A., Lawrence, D. P., and Baumgartner, K. (2020). Role of basidiomycete fungi in the grapevine trunk disease esca. *Plant Pathol.* 69, 205–220. doi: 10.1111/ppa.13116
- Bruez, E., Lecomte, P., Grosman, J., Doublet, B., Bertsch, C., Ugaglia, A., et al. (2013). Overview of grapevine trunk diseases in France in the 2000s. *Phytopathol. Mediterr.* 22, 5189–5206. doi: 10.1111/1462-2920.15180
- Bruez, E., Vallance, J., Gautier, A., Laval, V., Compant, S., Maurer, W., et al. (2020). Major changes in grapevine wood microbiota are associated with the onset of esca, a devastating trunk disease. *Environ. Microbiol.* 22, 5189–5206. doi: 10.1111/1462-2920.15180
- Bruez, E., Vallance, J., Gerbore, J., Lecomte, P., Da Costa, J.-P., Guerin-Dubrana, L., et al. (2014). Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of esca leaf-symptomatic and asymptomatic vines. *PLoS One* 9:e95928. doi: 10.1371/journal.pone.0095928
- Bruno, G., and Sparapano, L. (2006a). 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. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 69, 209–223. doi: 10.1016/j.pmpp.2007.04.008
- Bruno, G., and Sparapano, L. (2006b). 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. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 69, 182–194. doi: 10.1016/j.pmpp.2007.04.006
- Canale, M. C., Nunes Nesi, C., Falkenbach, B. R., Hunhoff Da Silva, C. A., and Brugnara, E. C. (2019). *Pleurostomophora richardsiae* associated with olive tree and grapevine decline in southern Brazil. *Phytopathol. Mediterr.* 58, 201–205. doi: 10.13128/Phytopathol_Mediterr-23357
- Carlsson, F., Edman, M., and Jonsson, B. G. (2017). Increased CO₂ evolution caused by heat treatment in wood-decaying fungi. *Mycol. Prog.* 16, 513–519. doi: 10.1007/s11557-017-1281-5
- Chambers, M. C., Maclean, B., Burke, R., Amodei, D., Ruderman, D. L., Neumann, S., et al. (2012). A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat. Biotechnol.* 30, 918–920. doi: 10.1038/nbt.2377
- Cholet, C., Bruez, E., Lecomte, P., Barsacq, A., Martignon, T., Giudici, M., et al. (2021). Plant resilience and physiological modifications induced by curettage of Esca-diseased grapevines. *OENO One* 55, 153–169. doi: 10.20870/oeno-one.2021.55.1.4478
- Cichewicz, R. H., Kouzi, S. A., and Hamann, M. T. (2000). Dimerization of resveratrol by the grapevine pathogen *Botrytis cinerea*. *J. Nat. Prod.* 63, 29–33. doi: 10.1021/np990266n
- Coines, J., Raich, L., and Rovira, C. (2019). Modeling catalytic reaction mechanisms in glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 53, 183–191. doi: 10.1016/j.cbpa.2019.09.007
- Daly, P., López, S. C., Peng, M., Lancefield, C. S., Purvine, S. O., Kim, Y., et al. (2018). *Dichomitus squalens* partially tailors its molecular responses to the composition of solid wood. *Environ. Microbiol.* 20, 4141–4156. doi: 10.1111/1462-2920.14416
- Del Frari, G., Oliveira, H., and Boavida Ferreira, R. (2021). White rot fungi (Hymenochaetales) and Esca of grapevine: insights from recent microbiome studies. *J. Fungi* 7:770. doi: 10.3390/jof7090770
- Doublet, B., Grosman, J., Lecomte, P., and Bruez, E. (2014). *Observatoire national des maladies du bois*. Paris: INRAE.
- Falade, A. O., Nwodo, U. U., Iweriebor, B. C., Green, E., Mabinya, L. V., and Okoh, A. I. (2017). Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiology Open* 6:e00394. doi: 10.1002/mbo3.394
- Fischer, M. (2002). A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). *Mycol. Prog.* 1, 315–324. doi: 10.1007/s11557-006-0029-4
- Flamini, R., De Rosso, M., De Marchi, F., Dalla Vedova, A., Panighel, A., Gardiman, M., et al. (2013). An innovative approach to grape metabolomics: stilbene profiling by suspect screening analysis. *Metabolomics* 9, 1243–1253. doi: 10.1007/s11306-013-0530-0
- Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R. A., Henrissat, B., et al. (2012). The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* 336, 1715–1719. doi: 10.1126/science.1221748
- Fontaine, F., Pinto, C., Vallet, J., Clément, C., Gomes, A. C., and Spagnolo, A. (2016). The effects of grapevine trunk diseases (GTDs) on vine physiology. *Eur. J. Plant Pathol.* 144, 707–721. doi: 10.1007/s10658-015-0770-0
- Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics (FAOSTATS) (2021). Data. Available at: <https://www.fao.org/faostat/en/#data> (Accessed April 4, 2022).
- Gabaston, J., Leborgne, C., Waffo-Tégou, P., Valls, J., Palos Pinto, A., Richard, T., et al. (2019). Wood and roots of major grapevine cultivars and rootstocks: a comparative analysis of stilbenes by UHPLC-DAD-MS/MS and NMR. *Phytochem. Anal.* 30, 320–331. doi: 10.1002/pca.2815
- Galarneau, E. R. A., Lawrence, D. P., Wallis, C. M., and Baumgartner, K. (2021). A comparison of the metabolomic response of grapevine to infection with ascomycete wood-infecting fungi. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 113:101596. doi: 10.1016/j.pmpp.2020.101596
- Gramaje, D., Úrbez-Torres, J. R., and Sosnowski, M. R. (2018). Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. *Plant Dis.* 102, 12–39. doi: 10.1094/PDIS-04-17-0512-FE
- Guerin-Dubrana, L., Fontaine, F., and Mugnai, L. (2019). Grapevine trunk disease in European and Mediterranean vineyards: occurrence, distribution and associated disease-affecting cultural factors. *Phytopathol. Mediterr.* 58, 49–71. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-25153
- Guerrero, R. F. (2016). Grapevine cane’s waste is a source of bioactive stilbenes. *Ind. Crop. Prod.* 94, 884–892. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.09.0550926-6690
- Hage, H., and Rosso, M.-N. (2021). Evolution of fungal carbohydrate-active enzyme portfolios and adaptation to plant cell-wall polymers. *J. Fungi* 7:185. doi: 10.3390/jof7030185
- Hiscox, J., Savoury, M., Vaughan, I. P., Müller, C. T., and Boddy, L. (2015). Antagonistic fungal interactions influence carbon dioxide evolution from decomposing wood. *Fungal Ecol.* 14, 24–32. doi: 10.1016/j.funeco.2014.11.001
- Hofrichter, M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzym. Microb. Technol.* 30, 454–466. doi: 10.1016/S0141-0229(01)00528-2
- Hofrichter, M., Scheibner, K., Bublitz, F., Schneegaß, I., Ziegenhagen, D., Martens, R., et al. (1999). Depolymerization of straw lignin by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii* is accompanied by release of carbon dioxide. *Holzforschung* 53, 161–166. doi: 10.1515/HF.1999.027
- Ibrahim, Q., and Kruse, A. (2020). Prehydrolysis and organosolv delignification process for the recovery of hemicellulose and lignin from beech wood. *Bioresour. Technol. Rep.* 11:100506. doi: 10.1016/j.biteb.2020.100506
- Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., et al. (2005). Exponentially modified protein abundance index (em PAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol. Cell. Proteomics* 4, 1265–1272. doi: 10.1074/mcp.M500061-MCP200
- Jandret, P., Douillet-Breuil, A.-C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., and Adrian, M. (2002). Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2731–2741. doi: 10.1021/jf011429s
- Jönsson, L. J., Palmqvist, E., Nilvebrant, N.-O., and Hahn-Hägerdal, B. (1998). Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 691–697. doi: 10.1007/s002530051233
- Karim, M., Daryaei, M. G., Torkaman, J., Oladi, R., Ghanbary, M. A. T., Bari, E., et al. (2017). Natural decomposition of hornbeam wood decayed by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 89, 2647–2655. doi: 10.1590/0001-3765201720160714
- King, B. C., Waxman, K. D., Nenni, N. V., Walker, L. P., Bergstrom, G. C., and Gibson, D. M. (2011). Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. *Biotechnol. Biofuels* 4:4. doi: 10.1186/1754-6834-4-4
- Krauss, M., Singer, H., and Hollender, J. (2010). LC–high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 943–951. doi: 10.1007/s00216-010-3608-9
- Labois, C., Stempien, E., Schneider, J., Schaeffer-Reiss, C., Bertsch, C., Goddard, M.-L., et al. (2021). Comparative study of secreted proteins, enzymatic activities of wood degradation and stilbene metabolism in grapevine botryosphera dieback fungi. *J. Fungi* 7:568. doi: 10.3390/jof7070568
- Laine, C. (2014). Structures of hemicelluloses and pectins in wood and pulp. [PhD Thesis]. Espoo (FI): Helsinki University of Technology.
- Lambert, C. (2011). *Étude du rôle des stilbènes dans les défenses de la vigne contre les maladies du bois*. [PhD Thesis]. Bordeaux (FR): University of Bordeaux 2.
- Lambert, C., Bisson, J., Waffo-Tégou, P., Papastamoulis, Y., Richard, T., Corio-Costet, M.-E., et al. (2012). Phenolics and their antifungal role in grapevine wood decay: focus on the Botryosphaeriaceae family. *J. Agric. Food Chem.* 60, 11859–11868. doi: 10.1021/jf303290g

- Lambert, C., Richard, T., Renouf, E., Bisson, J., Waffo-Téguo, P., Bordenave, L., et al. (2013). Comparative analyses of stilbenoids in canes of major *Vitis vinifera* L. cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 61, 11392–11399. doi: 10.1021/jf403716y
- Langgella, O., Valot, B., Balliau, T., Blein-Nicolas, M., Bonhomme, L., and Zivy, M. (2017). X!TandemPipeline: A tool to manage sequence redundancy for protein inference and phosphosite identification. *J. Proteome Res.* 16, 494–503. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00632
- Lecomte, P., Darrietort, G., Liminana, J.-M., Comont, G., Muruamendiariar, 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 Dis.* 96, 924–934. doi: 10.1094/PDIS-09-11-0776-RE
- Lekounougou, S., Mounquengui, S., Dumarçay, S., Rose, C., Courty, P. E., Garbaye, J., et al. (2008). Initial stages of *Fagus sylvatica* wood colonization by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: enzymatic characterization. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 61, 287–293. doi: 10.1016/j.ibiod.2007.06.013
- Manavalan, T., Manavalan, A., and Heese, K. (2015). Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi. *Curr. Microbiol.* 70, 485–498. doi: 10.1007/s00284-014-0743-0
- Markakis, E. A., Kavroulakis, N., Ntougias, S., Koubouris, G. C., Sergentani, C. K., and Ligoxigakis, E. K. (2017). Characterization of fungi associated with wood decay of tree species and grapevine in Greece. *Plant Dis.* 101, 1929–1940. doi: 10.1094/PDIS-12-16-1761-RE
- McCotter, S. W., Horianopoulos, L. C., and Kronstad, J. W. (2016). Regulation of the fungal secretome. *Curr. Genet.* 62, 533–545. doi: 10.1007/s00294-016-0578-2
- Mondello, V., Songy, A., Battiston, E., Pinto, C., Coppin, C., Trotel-Aziz, P., et al. (2018). Grapevine trunk diseases: A review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. *Plant Dis.* 102, 1189–1217. doi: 10.1094/PDIS-08-17-1181-FE
- Morel, M., Meux, E., Mathieu, Y., Thuillier, A., Chibani, K., Harvengt, L., et al. (2013). Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi: fungal xenomic networks. *Microb. Biotechnol.* 6, 248–263. doi: 10.1111/1751-7915.12015
- Morel-Rouhier, M. (2021). “Wood as a hostile habitat for ligninolytic fungi,” in *Wood Degradation and Ligninolytic Fungi Advances in Botanical Research*. eds. M. Morel-Rouhier and R. Sormani (London, UK: Academic Press), 115–149.
- Moretti, S., Pacetti, A., Pierron, R., Kassemeyer, H.-H., Fischer, M., Péros, J.-P., et al. (2021). *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch., the historical Esca agent: a comprehensive review on the main grapevine wood rot agent in Europe. *Phytopathol. Mediterr.* 60, 351–379. doi: 10.36253/phyto-13021
- Mugnai, L., Graniti, A., and Surico, G. (1999). Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Dis.* 83, 404–418. doi: 10.1094/PDIS.1999.83.5.404
- Nitsos, C. K., Choli-Papadopoulou, T., Matis, K. A., and Triantafyllidis, K. S. (2016). Optimization of hydrothermal pretreatment of hardwood and softwood lignocellulosic residues for selective hemicellulose recovery and improved cellulose enzymatic hydrolysis. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 4, 4529–4544. doi: 10.1021/acsuschemeng.6b00535
- Pacetti, A., Moretti, S., Perrin, C., Gelhaye, E., Bieler, E., Kassemeyer, H.-H., et al. (2022). Grapevine wood-degrading activity of *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch.: a focus on the enzymatic pathway regulation. *Front. Microbiol.* 13:844264. doi: 10.3389/fmicb.2022.844264
- Pacetti, A., Moretti, S., Pinto, C., Compant, S., Farine, S., Bertsch, C., et al. (2021). Trunk surgery as a tool to reduce foliar symptoms in diseases of the esca complex and its influence on vine wood microbiota. *J. Fungi* 7:521. doi: 10.3390/jof7070521
- Perez-Riverol, Y., Bai, J., Bandla, C., García-Seisdedos, D., Hewapathirana, S., Kamatchinathan, S., et al. (2022). The PRIDE database resources in 2022: a hub for mass spectrometry-based proteomics evidences. *Nucleic Acids Res.* 50, D543–D552. doi: 10.1093/nar/gkab1038
- Perrot, T., Salzet, G., Amusant, N., Beauchene, J., Gérardin, P., Dumarçay, S., et al. (2020). A reverse chemical ecology approach to explore wood natural durability. *Microb. Biotechnol.* 13, 1673–1677. doi: 10.1111/1751-7915.13540
- Pilar Martínez-Diz, M., Díaz-Losada, E., Andrés-Sodupe, M., Bujanda, R., Maldonado-González, M. M., Ojeda, S., et al. (2021). Field evaluation of biocontrol agents against black-foot and petri diseases of grapevine. *Pest Manag. Sci.* 77, 697–708. doi: 10.1002/ps.6064
- Rani Singhania, R., Dixit, P., Kumar Patel, A., Shekher Giri, B., Kuo, C.-H., Chen, C.-W., et al. (2021). Role and significance of lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs) in lignocellulose deconstruction. *Bioresour. Technol.* 335:125261. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125261
- 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. doi: 10.1094/PHTYO-09-18-0349-RVW
- Reiss, R., Ihssen, J., Richter, M., Eichhorn, E., Schilling, B., and Thöny-Meyer, L. (2013). Laccase versus laccase-like multi-copper oxidase: a comparative study of similar enzymes with diverse substrate spectra. *PLoS One* 8:e65633. doi: 10.1371/journal.pone.0065633
- Sahu, N., Merényi, Z., Bálint, B., Kiss, B., Sipos, G., Owens, R. A., et al. (2021). Hallmarks of Basidiomycete soft- and white-rot in wood-decay -omics data of two *Armillaria* species. *Microorganisms* 9:149. doi: 10.3390/microorganisms9010149
- Schilling, M., Farine, S., Péros, J.-P., Bertsch, C., and Gelhaye, E. (2021). “Wood degradation in grapevine diseases,” in *Wood Degradation and Ligninolytic Fungi Advances in Botanical Research*. eds. M. Morel-Rouhier and R. Sormani (London, UK: Academic Press), 175–207.
- Sparapano, L., Bruno, G., and Graniti, A. (2001). Three-year observation of grapevines cross-inoculated with esca-associated fungi. *Phytopathol. Mediterr.* 40, S376–S386. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-1643
- Stempien, E., Goddard, M.-L., Wilhelm, K., Tarnus, C., Bertsch, C., and Chong, J. (2017). Grapevine Botryosphaeria dieback fungi have specific aggressiveness factor repertory involved in wood decay and stilbene metabolism. *PLoS One* 12:e0188766. doi: 10.1371/journal.pone.0188766
- Surico, G. (2009). Towards a redefinition of the diseases within the esca complex of grapevine. *Phytopathol. Mediterr.* 48, 05–10. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-2870
- Surico, G., Mugnai, L., and Marchi, G. (2008). “The Esca disease complex,” in *Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria Integrated Management of Plant Pests and Diseases*. eds. A. Ciancio and K. G. Mukerji (Bari, IT, New Delhi, IN: Springer), 119–136.
- Suzuki, H., MacDonald, J., Syed, K., Salamov, A., Hori, C., Aerts, A., et al. (2012). Comparative genomics of the white-rot fungi, *Phanerochaete carnosus* and *P. chrysosporium*, to elucidate the genetic basis of the distinct wood types they colonize. *BMC Genom.* 13:444. doi: 10.1186/1471-2164-13-444
- Valette, N., Perrot, T., Sormani, R., Gelhaye, E., and Morel-Rouhier, M. (2017). Antifungal activities of wood extractives. *Fungal Biol. Rev.* 31, 113–123. doi: 10.1016/j.fbr.2017.01.002
- Van Soest, P. J., and McQueen, R. W. (1973). The chemistry and estimation of fibre. *Proc. Nutr. Soc.* 32, 123–130. doi: 10.1079/PNS19730029
- Vergara, C., Damm, A., Macke, S., Gorena, T., and Winterhalter, P. (2012). Stilbene levels in grape cane of different cultivars in southern Chile: determination by HPLC-DAD-MS/MS method. *J. Agric. Food Chem.* 60, 929–933. doi: 10.1021/jf204482c
- White, C.-L., Halleen, F., and Mostert, L. (2011). Characterisation of the fungi associated with esca diseased grapevines in South Africa. *Phytopathol. Mediterr.* 50, 204–223. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-8983
- Wong, D. W. S. (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 157, 174–209. doi: 10.1007/s12010-008-8279-z
- Zapata, C., Deléens, E., Chaillou, S., and Magné, C. (2004). Partitioning and mobilization of starch and N reserves in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *J. Plant Physiol.* 161, 1031–1040. doi: 10.1016/j.jplph.2003.11.009

Supplementary Material

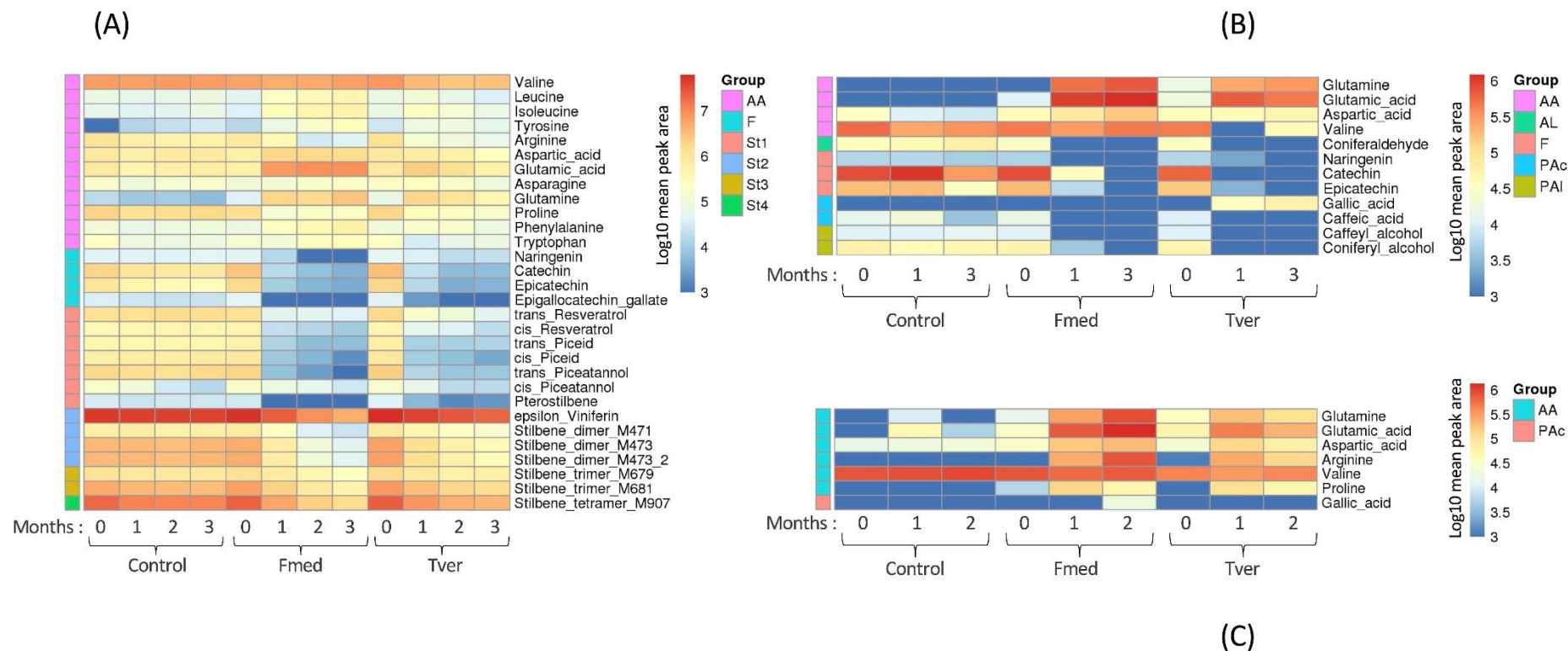
SUPPLEMENTARY TABLE S1 | Number of CAZYs upon their classification in Fmed and Tver secretomes for each modality, according to JGI database, and after selection of proteins for which emPAI relative abundancy was higher than 10 in at least one of the culture conditions.

¹Values for Fmed and Tver genomes are given according to (Floudas et al., 2012). CAZYs: carbohydrate active enzymes, GH: glycoside hydrolase, CBM: cellulose binding module, AA9: auxiliary enzyme family 9 (syn. LPMO: lytic polysaccharide monooxygenase), CE: carbohydrate enzyme, PL: polysaccharides lyase

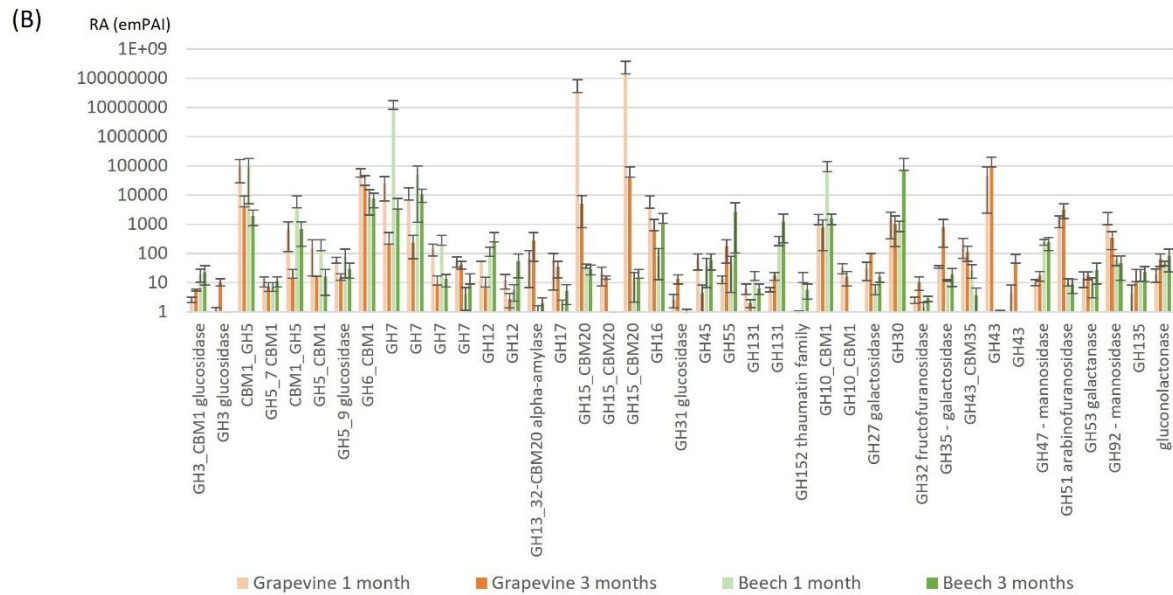
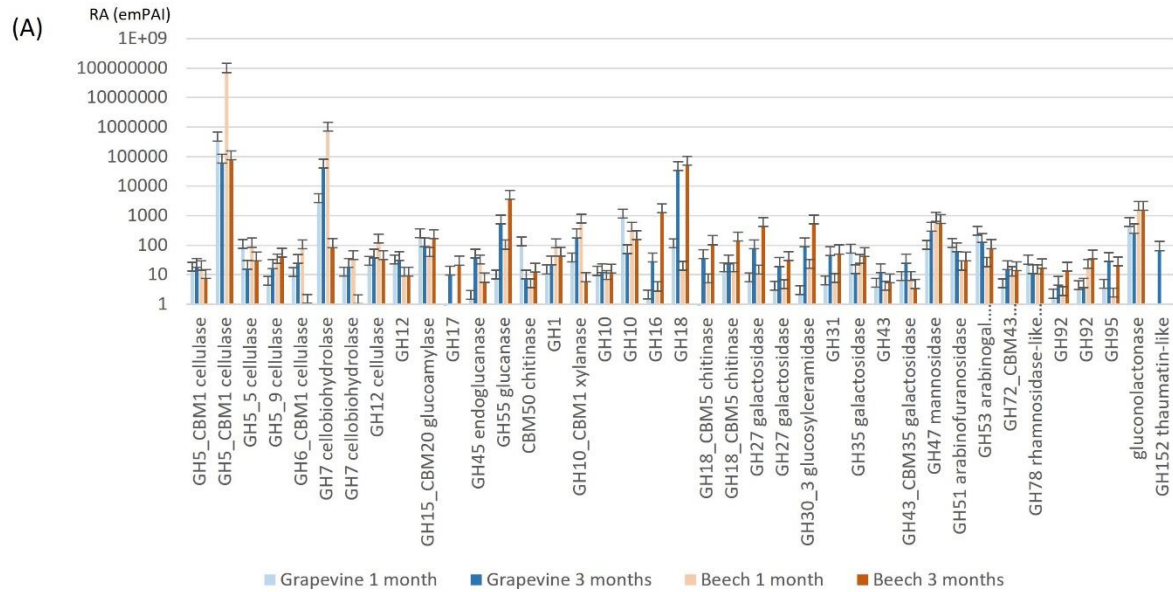
CAZYs families	Fmed									Tver								
	Genome ¹	All	Grapevine			Beech			Genome ¹	All	Grapevine			Beech				
			All	1month	3months	All	1month	3months			All	1month	3months	All	1month	3months		
GH3	7	0	0	0	0	0	0	0	0	11	2	0	0	1	1	1	1	
GH5	6	4	4	3	4	4	4	3	5	5	4	5	4	3	4	5	5	
GH6	2	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
GH7	2	2	2	1	2	2	2	1	4	4	4	3	3	3	3	3	3	
GH12	3	2	2	2	2	1	1	1	5	2	1	2	0	1	1	2	2	
GH13	-	0	0	0	0	0	0	0	-	1	1	1	1	1	0	0	0	
GH15	-	1	1	1	1	1	1	1	-	3	3	3	3	2	2	2	2	
GH17	-	1	0	0	0	0	0	1	-	1	1	1	1	1	0	0	0	
GH45	-	1	1	0	1	1	1	0	-	1	1	1	0	1	1	1	1	
GH55	-	1	1	0	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1	
GH131	-	0	0	0	0	0	0	0	-	2	1	0	1	1	2	1	1	
GH with CBM50	-	1	1	1	0	0	0	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	
AA9	13	2	2	2	2	2	2	2	18	5	3	4	1	3	3	3	3	
GH1	-	1	1	1	1	1	1	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	
GH10	4	3	3	2	3	2	2	2	6	2	2	2	2	1	1	1	1	
GH16	-	1	1	0	1	1	0	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1	
GH18	-	3	3	2	3	3	2	3	-	0	0	0	0	0	0	0	0	
GH27	-	2	2	0	2	2	1	2	-	2	2	2	2	2	1	2	2	

Chapitre 1 – Publication n°2

GH28	16	3	2	2	2	2	2	2	2	11	3	2	2	2	2	2	2
GH30	-	1	1	0	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1
GH31	-	1	1	0	1	1	0	1	1	-	1	0	0	1	0	0	0
GH32	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	1	0	0	1	0	0	0
GH35	-	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1
GH43	6	2	1	0	2	0	0	0	0	3	3	3	2	3	1	1	0
GH47	-	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1
GH51	-	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	0	1	0
GH53	-	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	0	1
GH72	-	1	0	0	1	1	0	1	1	-	0	0	0	0	0	0	0
GH74	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
GH78	-	1	1	1	1	1	1	1	1	-	0	0	0	0	0	0	0
GH79	-	1	1	1	1	0	0	1	1	-	0	0	0	0	0	0	0
GH92	-	2	0	0	0	1	1	2	2	-	1	1	1	1	1	1	1
GH95	-	1	1	0	1	0	0	1	1	-	0	0	0	0	0	0	0
GH135	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	1	0	0	1	1	1	1
GH152	-	1	1	0	1	0	0	0	0	-	1	0	0	0	0	1	0
Non-classified	-	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1
CE1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	2	2	2	2	2	2
CE4	-	2	2	0	2	2	2	2	2	-	1	0	0	0	1	0	1
CE7	-	2	1	0	1	2	2	2	2	-	0	0	0	0	0	0	0
CE8	3	1	0	1	0	0	0	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
CE12	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CE15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
CE16	6	1	1	0	1	1	1	1	1	7	3	2	1	2	2	1	3
PL1	-	1	1	1	1	1	1	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0
PL8	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	1	1	0	1	0	0	0



SUPPLEMENTARY FIGURE S1 | Heatmap of global metabolite profiles during the wood degradation process. Log₁₀ mean peak area of the indicated metabolites are given by shades of red, yellow, or blue colors according to the scale bar for (A) grapevine, (B) beech and (C) spruce cultures. Data represent the mean values of three biological replicates for each condition and time point. AA: amino acids; AL: aldehydes; F: flavonoid; PAc: phenolic acids; PAI: phenolic alcohols; St1–St4: Stilbene monomers, dimers, trimers and tetramers; MXXX: *m/z* in positive mode. C: control.



SUPPLEMENTARY FIGURE S2 | Relative abundance expressed as emPAI for all selected glycoside hydrolases in (A) Fmed and (B) Tver secretome on grapevine and beech 1- and 3-month cultures. Proteins for which emPAI relative abundance was higher than ten in at least one of the culture conditions were selected. RA: relative abundance.

Transition

Les premiers résultats de ce chapitre ont montré que Fmed (souche phco36) est capable de dégrader du bois de vigne cultivar (cv.) ‘Gewurztraminer’ et de hêtre, sains et sous forme de sciure *in vitro*. Sur les deux substrats, une dégradation de type simultanée (dégradation des trois principaux constituants du bois, lignine, hémicelluloses et cellulose de manière concomitante) a été montrée. L’ensemble des extractibles mesurés ont été dégradés au cours des cultures contrairement aux flacons contrôles. De plus, contrairement au modèle de pourriture blanche utilisé, Tver, les pertes de masses de la sciure de vigne exposée à Fmed pendant 3 mois étaient supérieures à celles observées lors de cultures sur sciure de hêtre, suggérant une préférence pour ce substrat. Bien qu’aucune différence morphologique n’ait été observée, les analyses métabolomiques et protéomiques ont également souligné des différences de comportement en fonction des deux substrats. Notamment, les variations en acides aminés dans les milieux de culture étaient différentes en fonction du substrat en présence de Fmed et en fonction de l’espèce fongique pour un même substrat. Enfin, Fmed est capable de réguler la composition de son sécrétome en fonction de son substrat, et sécrète une proportion plus importante d’oxydoréductases sur sciure de vigne. Pour compléter ces travaux, des expériences complémentaires ont été réalisées, avec pour objectifs d’une part de vérifier que ces premières observations n’étaient pas propres aux souches utilisées pour chaque espèce fongique, et d’autre part de proposer une méthode de suivi de la biomasse fongique au cours des cultures.

2. Etude de différentes souches de *F. mediterranea* et *T. versicolor* et estimation de la biomasse fongique

2.1. Introduction

En microbiologie, le terme de souche est utilisé afin de différencier des individus au sein d’une même espèce qui présentent des variations génétiques. Différentes souches d’une même espèce peuvent donc posséder des caractéristiques phénotypiques propres, par exemple en fonction de la niche écologique dans laquelle elles évoluent (Idnurm et al., 2005). Le génome de Fmed possède de nombreuses séquences répétitives, notamment des microsatellites (4 157 pour 11 333 gènes) et des transposons (41,42 % du génome, dont 27,58 % de classe I – de l’ARN, et 5,48 % de classe II – de l’ADN) (Floudas et al., 2012; Moretti et al., 2021). Ces dernières peuvent être à l’origine de nombreuses mutations au cours de la méiose, et donc contribuer à un important polymorphisme intraspécifique (Castanera et al., 2017). Une forte variabilité

génétique a en effet été observée entre 192 isolats de *F. punctata* (auparavant confondu avec Fmed), même au sein d'une population issue d'un même foyer (Jamaux-Desprésaux and Péros, 2003). Des différences phénotypiques entre souches de Fmed ont également été observées *in vitro*. Par exemple, des différences de vitesse de croissance, de pigmentation, et de pathogénicité sur différentes espèces de bois ont été montrées entre des souches de Fmed isolées de différents bois (vigne, olivier, grenadier, kumquat, poirier, arbre à soie) (Markakis et al., 2017). Lors de la dégradation *in vitro* de sciure de bois de vigne, quatre souches de Fmed, dont trois isolées de bois de vigne (phco36, LR124 et LR71) et une de bois d'olivier (235.01), ont produit des quantités de biomasse fongique et de protéines sécrétées différentes : la souche LR124 a produit deux fois plus de biomasse fongique que la souche phco36 en 10 jours de culture (Pacetti et al., 2022). De même, des blocs de bois de vigne exposés à cette souche ont perdu environ 30% de plus de masse sèche que ceux exposés à la souche phco36. Les gènes codant pour des laccases (5 parmi 6 mesurés) et des MnPs (3 gènes) étaient exprimés à des niveaux supérieurs par la souche LR124 au cours de cette dégradation. La souche LR124 a donc été choisie afin de la comparer avec la souche phco36 et d'observer d'éventuelles différences de comportement dans le cadre de nos expérimentations. Concernant le modèle de pourriture blanche utilisé, Tver, des différences phénotypiques intraspécifiques ont également été décrites (Deroy, 2015). La souche BRFM1532, isolée de bois de hêtre, a été choisie dans nos expérimentations pour ses différences avec la souche BRFM1218 : des différences morphologiques, une vitesse de croissance plus rapide pour la souche BRFM1532 sur milieu riche (malt-agar) et minimal (Tien and Kirk), et des différences au niveau des sécrétomes (davantage d'oxydoréductases dans le sécrétome de BRFM1532 sur bûchettes de chêne (aubier) ou de hêtre) entre les deux souches ont été observées.

La quantité de biomasse fongique produite est un des paramètres physiologiques qui permet de caractériser la capacité d'une souche à croître sur un substrat, et peut être caractéristique d'une stratégie de colonisation (Boddy and Heilmann-Clausen, 2008). En effet, une croissance relativement rapide est généralement associée à une stratégie de type « R », caractérisée également par des cycles de reproduction plus rapides et une tolérance de conditions de stress faibles, contrairement à la stratégie de type « S », caractérisée généralement par une croissance lente et une adaptation à des conditions de stress élevées. Une des façons d'estimer la production de biomasse fongique lorsque le mycélium ne peut être dissocié de son substrat, comme c'est le cas dans le bois par exemple, est de doser la teneur en ergostérol de ce substrat (Martin et al., 1990). Ce dernier est un constituant important de la membrane cellulaire et est

propre au règne fongique. Ses propriétés chimiques et mécaniques confèrent aux champignons une meilleure résistance à des stress environnementaux tels que l'oxydation (étant lui-même oxydé avant les phospholipides membranaires) ou des fortes variations d'humidité relative (Dupont et al., 2012). Des limites à cette méthode existent, notamment le fait que sa teneur dépende de l'espèce fongique mais aussi des conditions de culture et d'extraction. Cependant, l'ergostérol peut être utilisé comme indicateur de la quantité de biomasse fongique dans des conditions physiologiques données (Bermingham et al., 1995).

Les expérimentations suivantes ont pour objectif de vérifier si deux souches de Fmed et deux souches de Tver, ayant préalablement montré des différences phénotypiques intraspécifiques, ont un comportement différent ou non lors de la dégradation de sciure de bois de vigne (cv. 'Gewurztraminer'), hêtre ou épicéa. Ce comportement sera décrit par des données morphologiques, physiologiques (minéralisation du carbone, pertes de masse et composition en fibres de bois), métabolomiques et protéomiques. Un suivi de la biomasse fongique produite complétera enfin ces informations pour les quatre souches étudiées.

2.2. Matériels et Méthodes

2.2.1.1. Souches

Deux souches différentes de celles utilisées précédemment (Fmed phco36 et Tver BRFM1218) ont été utilisées : la souche Fmed LR124, isolée de bois de *V. vinifera* 'Carignan' à Villeneuve les Maguelone (Hérault, France) en 1996, fournie par le laboratoire LVBE (Université de Haute-Alsace, Colmar, France), et la souche Tver BRFM1532, isolée de bois de hêtre (*Fagus sp.*) en France, fournie par le CIRM-CF (INRAE/Aix-Marseille Université, Marseille, France).

2.2.1.2. Mises en culture et mesures

Les mises en culture de ces deux souches ont été réalisées tel que décrit précédemment (Schilling et al., 2022) sur les mêmes sciures de bois de vigne cv. 'Gewurztraminer', hêtre et épicéa. Sur sciure de vigne uniquement, le même protocole que précédemment a été appliqué, permettant d'obtenir des données de perte de masse, métabolomiques et de composition en fibres du bois à 0, 1, 2 et 3 mois de culture, ainsi que des données de protéomiques à 1 et 3 mois de culture, en triplicats. Les données de minéralisation du carbone sur vigne sont donc également une moyenne de 15 flacons le premier mois, 9 le deuxième et 6 le troisième mois.

Sur sciures de hêtre et d'épicéa, seules les données de minéralisation du carbone ont été mesurées, en triplicats.

L'ensemble des mesures ont été réalisées tel que décrit précédemment. Les mesures de composition en fibres du bois ont été réalisées par la plateforme ASIA (Université de Lorraine-INRAE; <https://a2f.univ-lorraine.fr/en/asia-2/>). Les extractions et analyses métabolomiques ciblées ont été réalisées en partenariat avec l'équipe Métabolisme et Santé de la Vigne (MSV) de l'UMR Santé de la Vigne et Qualité du Vin (SVQV, Université de Strasbourg) à l'INRAE de Colmar. Les analyses protéomiques ont été réalisées par la plateforme PAPPSO à Jouy-en-Josas (INRAE-région Ile-de-France-IBiSA-CNRS, <http://pappso.inra.fr>).

2.2.1.3. Répartition des constituants du mycélium des deux espèces parmi les fibres du bois

Afin d'estimer la répartition des constituants du mycélium au cours de l'analyse des fibres du bois, une gamme par ajouts dosés pour chaque espèce fongique a été réalisée. Des quantités croissantes de mycélium ont été mélangées avec de la sciure lyophilisée et broyée de bois de vigne cv. 'Gewurztraminer' sain et préalablement séché 48h à 105°C. Le mycélium utilisé a été récolté après culture sur malt-agar à 27°C pendant 7 mois en présence de bois (blocs de bois de hêtre de 50x12,5 x25mm), avec renouvellement régulier de l'oxygène (par ouverture des boîtes de culture pendant 1h par semaine en conditions stériles), puis lyophilisé et broyé avant d'être mélangé à la poudre de bois dans les proportions données dans le Tableau 1. Chacun de ces mélanges a été soumis au protocole d'analyse des fibres du bois (Van Soest and McQueen, 1973), réalisé par la plateforme ASIA (Université de Lorraine-INRAE). Une seule souche par espèce (Fmed phco36 et Tver BRFM1532) a été utilisée pour des raisons techniques.

Tableau 1: masses de mycélium et de bois mélangés pour la préparation de la gamme par ajouts dosés

Souche	Mycélium (mg)	Bois (mg)	Mycélium (%)
Fmed phco36	0	404,9	0
Fmed phco36	49,2	357,5	12
Fmed phco36	90,8	345,3	21
Fmed phco36	121,6	314,9	28
Fmed phco36	164	270,9	38
Tver BRFM1532	0	450,4	0
Tver BRFM1532	54,7	409,5	12
Tver BRFM1532	95,4	323,8	23
Tver BRFM1532	135,6	284,3	32
Tver BRFM1532	163,1	250,8	39

2.2.1.4. Extraction de l'ergostérol dans les échantillons

Les dosages de l'ergostérol dans les cultures ont été réalisés sur sciure de vigne pour les quatre souches étudiées et à chaque mois de culture, et sur sciure de hêtre uniquement pour les souches Fmed phco36 et Tver BRFM1218 à 0, 1 et 3 mois de culture. Pour chaque dosage, 75,0 mg de culture lyophilisée et broyée ont été extraits dans 1mL de méthanol avec assistance aux ultrasons pendant 10 minutes, en triplicat. Après centrifugation à +4°C 10 minutes à 13 400 tours par minute (rpm), les surnageants ont été filtrés à 0,45 µm puis analysés par Chromatographie Liquide à Haute-Performance (HPLC) couplée à un détecteur à Ultra-Violet à barrette de diode (UV-DAD) réglé à 282 nm.

2.2.1.5. Extraction de l'ergostérol dans le mycélium seul

Afin d'estimer la teneur en ergostérol dans le mycélium seul, une gamme par ajouts dosés a été réalisée pour le mycélium des souches Fmed LR124, phco36 et Tver BRFM1532. Le mycélium de ces trois souches a été obtenu par le même protocole que décrit au paragraphe 2.2.1.3.), puis lyophilisé et broyé également. Les quantités de mycélium et de bois de vigne (cv. 'Gewurztraminer' sain, séché, lyophilisé et broyé) données dans le Tableau 2 ont été extraites et analysés comme décrit précédemment, en ajustant le volume de méthanol de façon à conserver le même ratio d'extraction de 1mL/75mg.

Tableau 2: quantités de mycélium et de poudre de bois de vigne mélangés pour extraction au méthanol et dosage de l'ergostérol par HPLC-UV-DAD

Souche	Mycélium (mg)	Bois de vigne (mg)	Mycélium (%)
Fmed phco36	1.1	70.7	1.53
Fmed phco36	5.8	69.4	7.71
Fmed phco36	14.9	64.9	18.67
Fmed phco36	25.9	56.5	31.43
Fmed phco36	45.9	33.9	57.52
Fmed LR124	8	63	11.27
Fmed LR124	16.7	52.6	24.10
Fmed LR124	28	46.1	37.79
Fmed LR124	46	31.7	59.20
Tver BRFM1532	0.9	77.6	1.15
Tver BRFM1532	5.7	62.5	8.36
Tver BRFM1532	12.3	56	18.01
Tver BRFM1532	23.2	46.5	33.29
Tver BRFM1532	44.9	26.8	62.62

2.2.1.6. Analyse HPLC- UV-DAD

Le dosage de l'ergostérol par HPLC-UV-DAD a été réalisé à l'aide d'une chaîne UFLC (Shimadzu[®]) équipée d'une colonne Kinetex[®] C18 (100 mm x 4,6 mm x 2,6 µm) elle-même équipée d'une pré-colonne (Phenomenex[®]). La phase mobile isocratique était constituée de 95% de méthanol avec un débit de 1,6 mL/min. Une gamme de standard commercial d'ergostérol (Sigma-Aldrich[®]) a été réalisée aux concentrations suivantes : 25, 50, 75, 100, 150, 175 et 200 µg/mL. L'intégration manuelle des pics à 282nm (temps de rétention 4,2 min) a permis d'obtenir la relation suivante :

$$\text{Aire du pic} = 105\,486 * \text{concentration en ergostérol}$$

où l'aire du pic est en unités arbitraires et la concentration en ergostérol en µg/mL, et avec un coefficient de corrélation (R^2) de 0.9956. Ces concentrations en ergostérol des extraits (en µg/mL) ont ensuite été converties en concentrations dans les cultures (en ng/mg sec) par la relation :

$$\text{Concentration dans la culture} = \text{concentration dans l'extrait} * R$$

où $R = \frac{1000}{75}$ correspondant au ratio d'extraction en µL/mg (1mL/75mg).

2.2.1.7. Statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel Rstudio[®]. La normalité des données a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk, puis soit le test paramétrique à comparaison multiple de Student-Newman-Keuls, soit le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis avec comparaison multiple de Conover-Inman ont été appliqués.

2.3. Résultats

2.3.1.1. Observations morphologiques

Les souches LR214 et BRFM1532 ont montré des morphologies similaires à celles des souches phco36 et BRFM1218 respectivement (Figure 18). Tout comme la souche Fmed phco36, la souche Fmed LR124 a une morphologie aérienne (colonisation d'un grand volume de la flasque) et colorée (jaunâtre) sur vigne et sur hêtre. Un fin mycélium blanc est observé sur sciure d'épicéa ainsi qu'un changement de couleur de la sciure (plus foncée en présence du champignon). Les cultures de Tver BRFM1532 ont une morphologie similaire à celles de Tver

BRFM1218 sur hêtre et sur épicéa. Sur vigne au contraire, une coloration jaune est observée dès le premier mois.

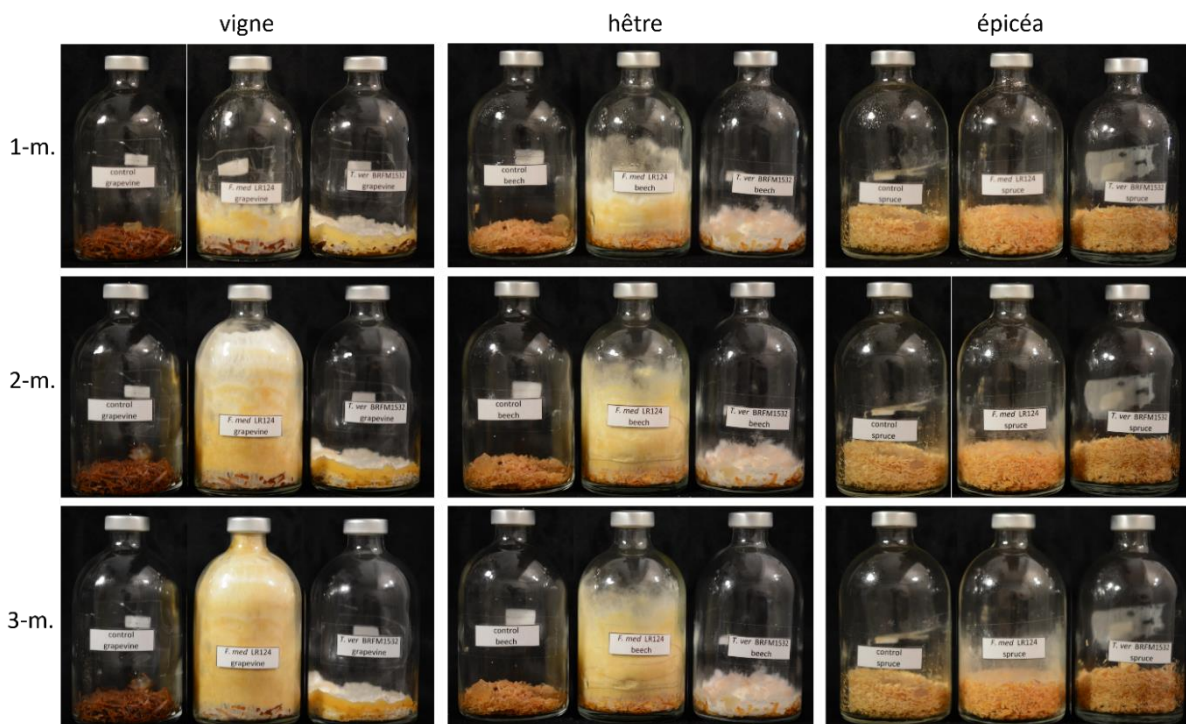


Figure 18: cultures sur sciure de vigne, hêtre et épicéa après 1(1-m.), 2 (2-m.) et 3 mois (3-m.) à 27°C (©Marion Schilling).

2.3.1.2. Minéralisation du carbone

Les taux de minéralisation du carbone des souches LR124 et BRFM1532 ont été mesurés au cours des trois mois de culture sur sciure de vigne, hêtre ou épicéa, et sont exprimés en mg de carbone minéralisé par jour (mgC/j). Pour les cultures de Fmed LR124 (Figure 19a), ces taux sont constants entre le 9^{ème} jour et le dernier jour de l'expérience sur vigne, entre le 16^{ème} et le dernier jour sur hêtre, tandis qu'un pic est observé uniquement entre le 16^{ème} et le 30^{ème} jour sur épicéa. Les allures sont donc similaires à celles observées dans les cultures de Fmed phco36. Sur vigne, le taux de minéralisation des cultures de Tver BRFM1532 (Figure 19b) augmente rapidement (avant le 9^{ème} jour) puis se stabilise, de façon similaire aux deux souches de Fmed. Sur hêtre, la phase d'augmentation est plus rapide dans les cultures de Tver BRFM1532 (avant le 9^{ème} jour) que celles des cultures de Fmed, puis diminue légèrement dès le 30^{ème} jour. Sur épicéa, un pic est observé dès le 9^{ème} jour, plus tôt donc que les cultures de Fmed, puis le taux de minéralisation diminue rapidement jusqu'au 30^{ème} jour de culture. Ces observations sont donc différentes de celles obtenues avec la souche Tver BRFM1218. En effet, sur sciure de vigne, le taux de minéralisation en présence de Tver BRFM1218 chutait après le 42^{ème} jour. Sur

sciure de hêtre, son augmentation était plus lente (taux maximal atteint à partir du 15^{ème} jour de culture) et sa diminution plus tardive (après le 42^{ème} jour).

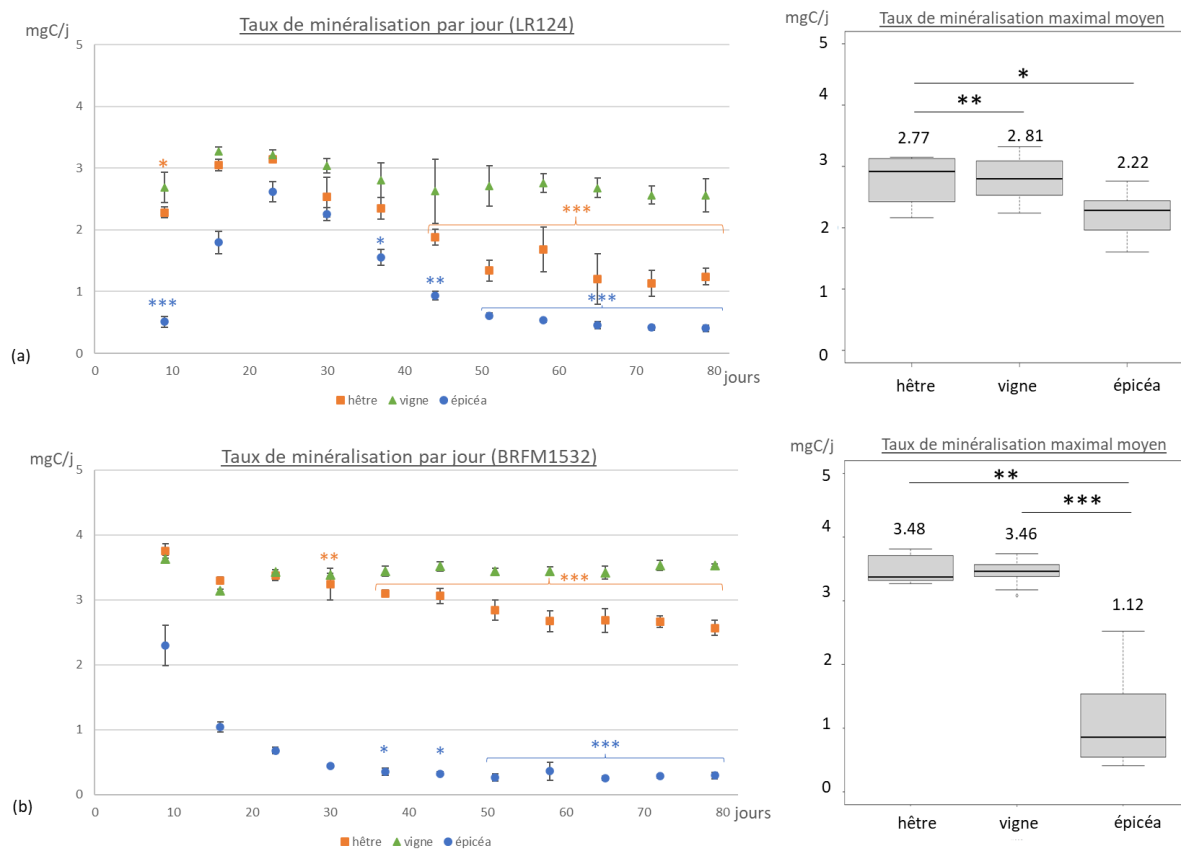


Figure 19: taux de minéralisation du carbone par jour de culture au cours des 3 mois de culture et taux de minéralisation maximaux des cultures de (a) Fmed LR124 et (b) Tver BRFM1532 sur sciure de vigne cv. 'Gewurztraminer', hêtre et épicéa. Tests statistiques au cours de la culture : Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple de Conover-Iman. Tests entre les taux maximums : test de Tukey. Pour tous les tests : * = p -value < 0.05, ** = p -value < 0,005 et *** = p -value < 0.001.

Les taux de minéralisation maximaux (Figure 19a-b) ont été calculés comme précédemment (Schilling et al., 2022), c'est-à-dire en réalisant la moyenne des taux les plus élevés et stables (non-différents statistiquement). Les taux maximaux des cultures de Fmed LR124 sur vigne et sur hêtre (respectivement 2,81 et 2,77 mgC/j) sont équivalents à ceux des cultures de Fmed phco36 (resp. 2,55 et 2,46 mgC/j). Sur épicéa (2,22 mgC/j), il est au contraire supérieur à celui des cultures de Fmed phco36 (1,27mgC/j).

Sur sciure de vigne, des différences entre les deux souches de Tver sont observées : les taux de minéralisation maximaux des cultures de Tver BRFM1532 sur vigne (3,46 mgC/j) sont supérieurs à ceux observés avec Tver BRFM1218(2,94 mgC/j). Les taux maximaux des cultures des deux souches de Fmed leurs sont inférieurs sur vigne et sur hêtre (3,22 et 3,48 mgC/j resp. pour BRFM1218 et BRFM1532). Cependant sur sciure d'épicéa, le taux maximal des cultures

de Fmed LR124 est supérieur à celui des cultures des deux souches de Tver (resp. 1,00 et 1,12 mgC/j pour BRFM1218 et BRFM1532) alors que celui de Fmed phco36 leur est équivalent.

2.3.1.3. Pertes de masse

Les pertes de masses obtenues après 1, 2 et 3 mois de culture des souches Fmed LR124 et Tver BRFM1532 sur sciure de vigne, exprimées en pourcentage par rapport aux cultures contrôles, ont été comparées à celles obtenues précédemment avec les souches Fmed phco36 et Tver BRFM1218 (Figure 20). La seule différence entre deux souches d'une même espèce est observée pour les cultures de Tver après 3 mois. En effet, la perte de masse la plus importante (35%) est observée en présence de Tver BRFM1532. Les pertes de masse observées après 2 mois avec les deux souches de Fmed (resp. 15 et 16% avec Fmed LR124 et phco36) sont plus faibles que celles avec les deux souches de Tver (resp. 19 et 21% avec BRFM1218 et BRFM1532). Après 3 mois de culture (resp. 22 et 24%), elles sont plus faibles qu'avec la souche Tver BRFM1532 et identiques à celle avec la souche BRFM1218 (22%).

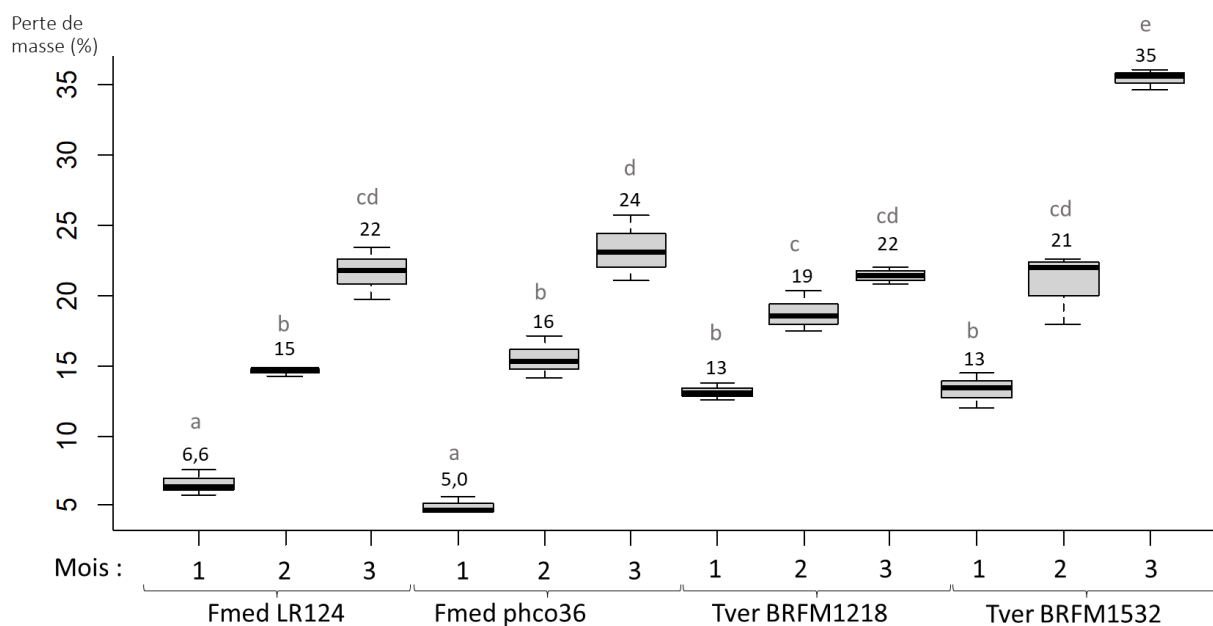


Figure 20: pertes de masses des cultures de Fmed LR124 et phco36 et de Tver BRFM1218 et BRFM1532 sur sciure de vigne après 1, 2 et 3 mois de culture. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de masse sèche par rapport aux contrôles (= sciure non inoculée). Les boîtes à moustache représentent la médiane ainsi que les 1^{er} et 3^{ème} quartiles, et les valeurs indiquées correspondent à la moyenne des triplicats. Tests statistiques : comparaison multiple de Student-Newman-Keuls (p -value < 0,005 entre deux groupes).

2.3.1.4. Composition en fibres du bois

La composition en fibres du bois des cultures de Fmed LR124 et Tver BRFM1532 sur sciure de vigne a été mesurée après chaque mois de culture par une méthode adaptée de celle de Van

Soest and McQueen (1973), permettant d'obtenir les proportions en composés solubles, lignine, hémicelluloses et cellulose (Figure 21). Aucune différence entre les proportions de lignine, hémicelluloses et cellulose n'est observée, bien que la perte de masse soit significative (Figure 20). Ces observations révèlent donc un mode de dégradation de type simultané pour les souches Fmed LR124 et Tver BRFM1532, de façon similaire aux souches Fmed phco36 et Tver BRFM1218 (Schilling et al., 2022). Après 3 mois de culture, la proportion en composés solubles des cultures de BRFM1532 augmente de 18 à 27%, ce qui suggère une accumulation soit de produits de dégradation du bois solubles, soit de composés solubles du mycélium (soit des deux). Ces observations soulignent la différence de comportement entre la souche Tver BRFM1532 et la souche Tver BRFM1218, pour laquelle au contraire, une diminution de la part des solubles était observée après 3 mois de culture.

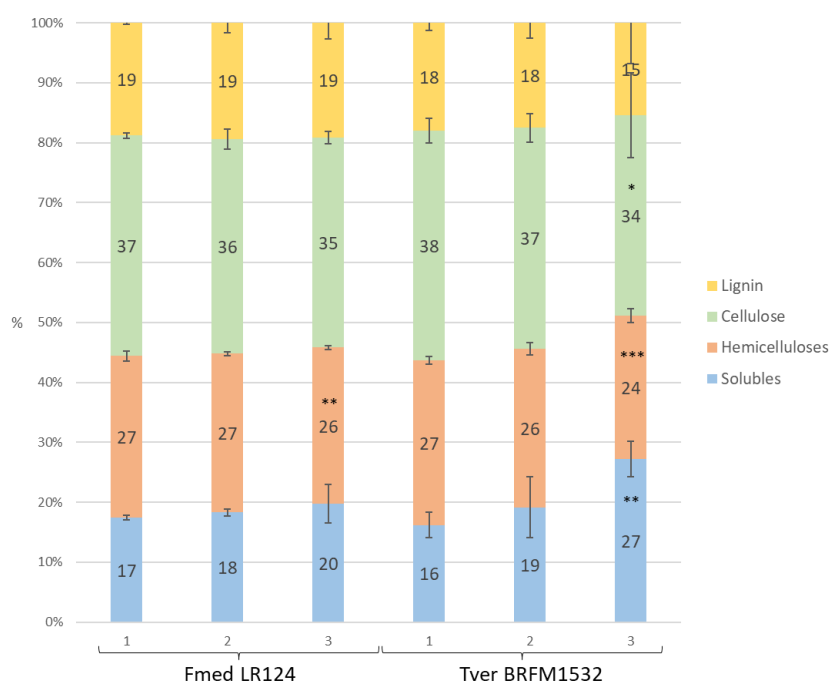


Figure 21: composition en fibres du bois des cultures de Fmed LR124 et Tver BRFM1532 après 1, 2 et 3 mois de culture. Tests statistiques : comparaison multiple de Student-Newman-Keuls par rapport au contrôle (* : p-value < 0,05, ** : p-value < 0,001, μμ* : p-value < 0,001). (Valeurs du contrôle - cf Article - : 19, 35, 28 et 18%).

Afin d'évaluer l'impact de la formation de mycélium sur la composition en fibres du bois des cultures, une estimation de la répartition des constituants dans le mycélium des deux espèces fongiques a été réalisée, pour les souches Fmed phco36 et Tver BRFM1532. Des quantités connues de mycélium en présence de bois de vigne ont été soumises au protocole de détermination de la teneur en fibres du bois et leurs répartitions entre les différents types de constituants ont été calculées (Figure 22).

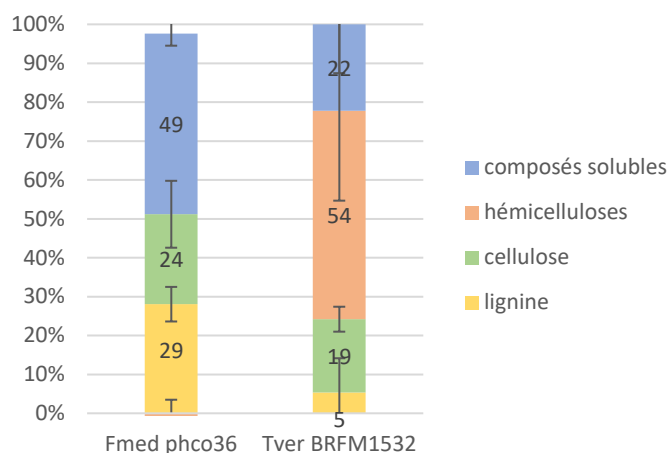


Figure 22: répartition des constituants des mycéliums de *Fmed phco36* et *Tver BRFM1532* selon le protocole d'estimation des teneurs en fibres du bois.

Des compositions différentes sont observées entre les deux espèces : 49% du mycélium de *Fmed* est retrouvé dans la partie soluble (contre 22% du mycélium de *Tver*) tandis que 54% de celui de *Tver* est retrouvé dans la partie hémicelluloses (contre 0% du mycélium de *Fmed*).

2.3.1.5. Analyses métabolomiques ciblées

Des analyses métabolomiques ciblées ont été réalisées à partir des cultures de chaque souche sur sciure de vigne à 0, 1, 2 et 3 mois. Les métabolites ciblés étaient des métabolites primaires (acides aminés) et des extractibles connus du bois de vigne (stilbènes, flavonoïdes). La figure 23 montre les variations significatives pour chacun des métabolites ciblés dans les cultures de *Fmed* LR124 et de *Tver* BRFM1532 aux temps 0, 1, 2 et 3 mois, par rapport aux cultures contrôles correspondantes (sciure de vigne seule). Les données obtenues précédemment avec *Fmed* phco36 et *Tver* BRFM1218 sont comparées dans la même figure. Une majorité des acides aminés (leucine, isoleucine, tyrosine, glutamate, glutamine, phénylalanine et tryptophane) augmente en présence de *Fmed* LR124 et de *Tver* BRFM1532. Certains d'entre eux (aspartate en présence de *Fmed* et asparagine en présence de *Tver* BRFM1532) n'augmentent qu'en présence de *Fmed* ou d'une des souches de *Tver* (BRFM1532) respectivement. Concernant les acides aminés, les deux souches de *Fmed* ont des comportements similaires alors que *Tver* BRFM1532 a un comportement différent par rapport à *Tver* BRFM1218 : les variations des acides aminés dans la culture en sa présence sont plus proches de celles observées en présence des deux souches de *Fmed* que de *Tver* BRFM1218.

Concernant les extractibles, des comportements similaires sont observés entre les deux souches de *Fmed* et la souche *Tver* BRFM1532 : les abondances relatives de tous les extractibles par

rapport aux flacons contrôles diminuent au cours des cultures, et ce davantage que dans les cultures de Tver BRFM1218.

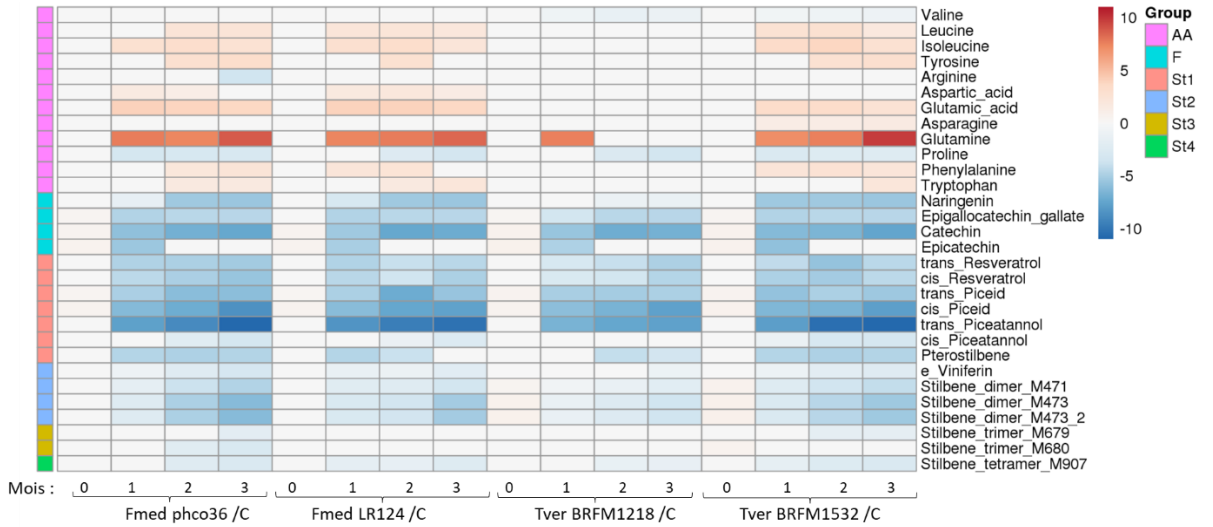


Figure 23: différences significatives en Log2 entre les abondances de métabolites cibles dans les cultures de Fmed phco36 et LR124 et de Tver BRFM1218 et BRFM1532 par rapport aux contrôles respectifs à 0, 1, 2 et 3 mois de culture.

2.3.1.6. Analyses protéomiques

Les analyses protéomiques des sécrétomes de Fmed LR124 et de Tver BRFM1532 ont été réalisées à 1 et 3 mois de culture sur sciure de vigne. Les abondances relatives moyennes des principales familles de protéines rencontrées sont présentées dans la Figure 24. Pour les deux espèces, environ un tiers des protéines sécrétées sont des oxydoréductases, de familles protéiques différentes : les oxydoréductases du sécrétome de Fmed LR124 sont principalement des MnPs (24% du sécrétome) et des laccases (7%), tandis que celles de Tver BRFM1532 sont principalement des LiPs (15%) et des MnPs (7%), avec 1% de laccases. Une autre classe de peroxydases est également représentée, les peroxydases décolorantes (DyPs).

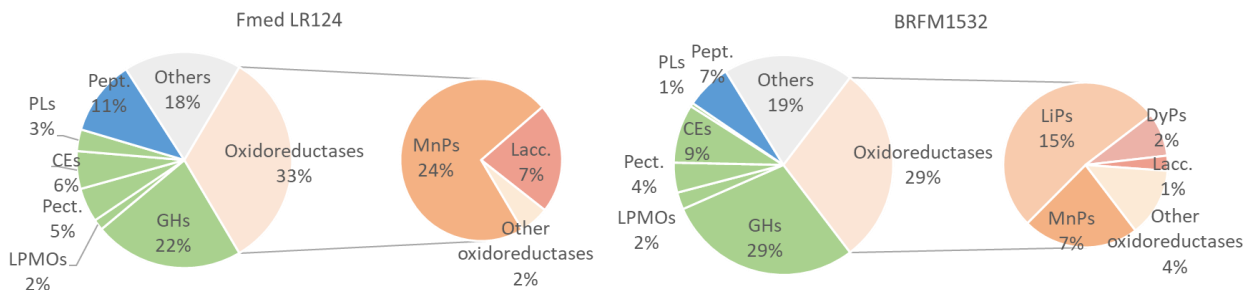


Figure 24: abondances relatives des principales familles de protéines des sécrétomes de Fmed LR124 et Tver BRFM1532 sur sciure de bois de vigne à 1 et 3 mois de culture (moyenne). CEs : estérases à carbohydrates, DyPs : peroxydases décolorantes, GHs : hydrolases à glycosides, Lacc. : Laccases, LiPs : peroxydases à lignine, LPMOs : mono-oxygénases lytiques à polysaccharides (anciennement AA9s pour Auxillary Active enzymes famille 9), MnPs : peroxydases à manganese, Pect. : Pectinases, Pept. : Peptidases, PLs : lyases à polysaccharides.

Peu de différences sont observées entre les compositions des sécrétomes des deux souches de Fmed. Au contraire, des différences entre les sécrétomes des deux souches de Tver sur sciure de vigne sont observées. Environ un tiers des protéines sécrétées par Tver BRFM1532 sont des oxydoréductases alors qu'elles représentaient seulement 21% des protéines sécrétées par Tver BRFM1218. La composition du sécrétome de Tver BRFM1532 sur sciure de vigne est proche de celle de Tver BRFM1218 sur sciure de hêtre.

2.3.1.7. Teneur en ergostérol dans les cultures

Les teneurs en ergostérol sont données à 1, 2 et 3 mois de culture pour les quatre souches sur vigne (Figure 25a) et pour Fmed phco36 et Tver BRFM1218 sur hêtre (Figure 25b). L'ergostérol est un composé photosensible et thermosensible. C'est pourquoi il est important de noter que la durée et les conditions de stockage entre la lyophilisation et le dosage des échantillons ont été différentes selon le substrat (conservation courte pour les échantillons de hêtre, et plusieurs semaines à + 4°C pour ceux de vigne). Les teneurs obtenues seront donc comparées uniquement pour un même substrat.

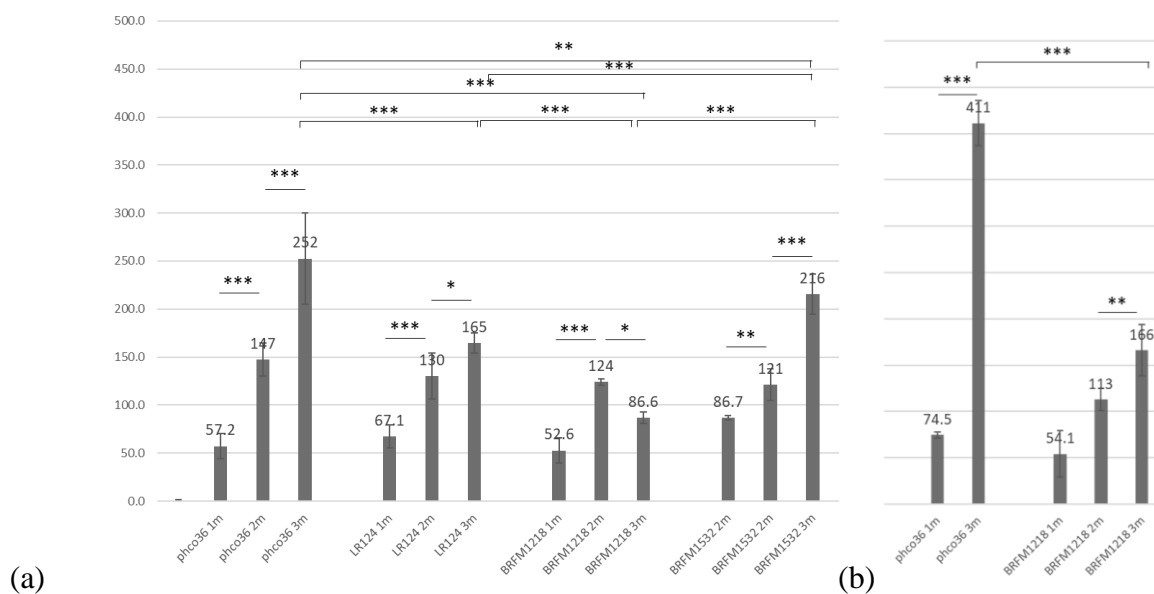


Figure 25: teneurs en ergostérol des cultures (a) de Fmed phco36 et LR124 et de Tver BRFM1218 et BRFM1532 sur vigne, et (b) de Fmed phco36 et Tver BRFM1218 sur hêtre à 1, 2 et 3 mois de culture, obtenues par dosage HPLC-DAD-UV. La valeur à 2 mois de la culture de *F. mediterranea* phco36 sur hêtre est manquante.

Sur sciure de vigne, les teneurs en ergostérol de Fmed phco36 et LR124, et de Tver BRFM1532 augmentent au cours des cultures. Au contraire, en présence de Tver BRFM1218, la teneur en ergostérol augmente les deux premiers mois puis baisse. Après 3 mois de culture, elles sont supérieures à celles des cultures de Tver BRFM1218 en présence des deux souches de Fmed, alors que la souche Tver BRFM1532 a une teneur intermédiaire entre les cultures des deux

souches de Fmed. On observe donc une variabilité intraspécifique pour les deux espèces sur vigne, mais une évolution (augmentation progressive) similaire entre les deux souches de Fmed et la souche Tver BRFM1532.

Sur sciure de hêtre, les teneurs en ergostérol de Fmed phco36 et de Tver BRFM1218 augmentent au cours des cultures. Après 3 mois de culture, elle est environ 2 fois supérieure dans les cultures de Fmed phco36 que de Tver BRFM1218. L'augmentation est donc plus importante dans les cultures de Fmed phco36 que de Tver BRFM1218 sur hêtre.

2.3.1.8. Estimation de la biomasse fongique dans les cultures

La teneur en ergostérol peut être utilisée en tant qu'indicateur de la biomasse fongique. Cependant, elle varie notamment en fonction de l'espèce fongique et de ces conditions physiologiques. Les teneurs en ergostérol de mycélium seul ont été mesurées pour chacune des espèces en culture, et sont de $300^{+/-16}$ et $33^{+/-34}$ ng/mg sec de mycélium respectivement pour Fmed (moyenne entre LR124 et phco36) et Tver BRFM1532. Ces teneurs ont permis d'obtenir des estimations de biomasse fongique, comparables entre elles uniquement par espèce fongique et par condition de culture (Figure 26a-b).

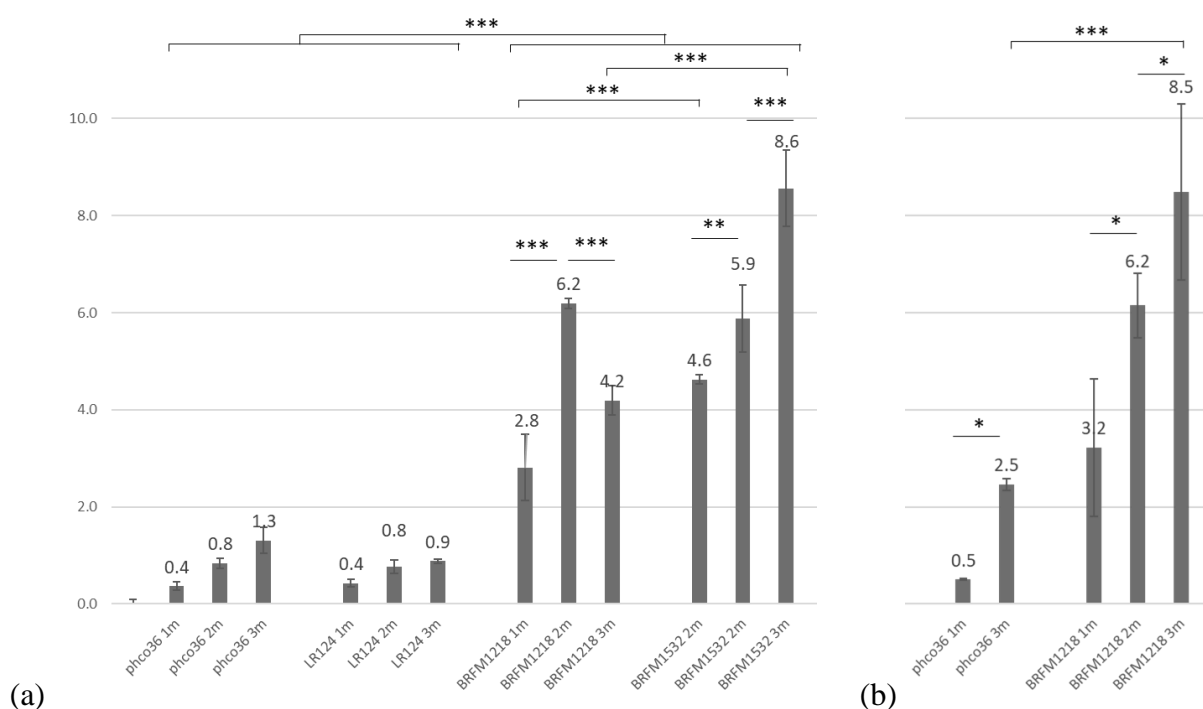


Figure 26: biomasses fongiques estimées d'après leurs teneurs en ergostérol des cultures (a) de Fmed phco36 et LR124 et de Tver BRFM1218 et BRFM1532 sur vigne, et (b) de Fmed phco36 et Tver BRFM1218 sur hêtre à 1, 2 et 3 mois de culture.

Une augmentation de la biomasse des deux souches de Fmed et de Tver BRFM1532 est observée au cours des 3 mois de culture sur sciure de vigne. Une augmentation est observée

pour les ucltures de Fmed phco36 et Tver BRFM1218 sur sciure de hêtre. La biomasse fongique estimée de Tver BRFM1218 sur sciure de vigne diminue quant à elle entre 2 et 3 mois, de façon cohérente avec les résultats de teneurs en ergostérol (Figure 25a). La teneur en biomasse fongique de Tver est estimée supérieure à celle de Fmed, du fait des résultats obtenus à partir des mycéliums seuls. Cependant, les conditions physiologiques étant différentes, des analyses complémentaires seraient nécessaires.

2.4. Discussion et conclusion

Le suivi d'une deuxième souche pour chacune des espèces Fmed et Tver a permis d'observer un comportement proche entre les deux souches de Fmed. Sur les trois substrats en effet, leurs morphologies et l'allure des taux de minéralisation du carbone étaient similaires. Sur sciures de vigne et de hêtre, les taux de minéralisation maximaux étaient similaires pour les deux souches. Sur sciure de vigne uniquement, les pertes de masse, le schéma de dégradation de type simultané, les variations des acides aminés et des extractibles, la composition du sécrétome, la teneur en ergostérol et la biomasse produite estimée étaient similaires également.

Parmi les caractères similaires entre les deux souches de Fmed, certains étaient partagés soit avec les deux souches soit avec une seule souche de Tver, et ne sont donc pas propres à l'espèce Fmed. Les caractères communs entre les quatre souches sont notamment (i) leur capacité à dégrader les sciures de vigne et de hêtre dans les conditions de l'expérimentation, et (ii) d'adopter un schéma de dégradation de type simultané (dans les cultures où les analyses de fibres de bois ont été réalisées). Il est intéressant de noter qu'un comportement sensiblement différent est observé entre les deux souches de Tver. La souche Tver BRFM1532 présente davantage de caractéristiques similaires à ceux de Fmed que la souche Tver BRFM1218. Les caractères communs entre Fmed et Tver BRFM1532 sont les suivants : (i) les trois souches montrent une coloration jaune sur sciure de vigne, (ii) leurs taux de minéralisation du carbone sur vigne sont stables, (iii) leurs taux de minéralisation maximaux sont similaires pour chaque espèce sur hêtre et sur vigne, (iv) les variations d'acides aminés et extractibles en présence des trois souches sont similaires, et (v) leurs teneurs en ergostérol augmentent au cours des trois mois de culture sur sciure de vigne. Les pigments fongiques peuvent jouer un rôle protecteur face à un stress grâce à des propriétés antioxydantes ou antiradicalaires par exemple (Tran-Ly et al., 2020). Il est possible que la coloration observée dans le mycélium de toutes les cultures de Fmed témoigne d'une adaptation à croître dans des milieux stressants (réponse de la vigne, présence de nombreux micro-organismes, ...). Le fait que Tver BRFM1532 soit capable de

produire une coloration également sur vigne suggère d'une part que ce substrat est source de stress pour le champignon, et d'autre part souligne des capacités différentes entre les souches de Tver à répondre à ce stress. Il serait intéressant d'identifier la nature des pigments produits ou de réaliser un suivi transcriptomique afin de mieux comprendre les mécanismes mis en place par Fmed et Tver. Les allures et les valeurs maximales des taux de minéralisation du carbone et des teneurs en ergostérol suggèrent que Fmed ne soit pas plus avantage à croître sur ce substrat que Tver BRFM1532. Les variations des teneurs en extractibles dans les cultures de vigne des deux souches de Fmed et de Tver BRFM1532 montrent que ces trois souches sont capables de dégrader ou de métaboliser ces métabolites. Cette capacité, dans les conditions de l'expérience, ne semble donc pas être un facteur favorisant la croissance de Fmed sur sciure de vigne par rapport à celle d'une autre espèce telle que Tver. Les diminutions des teneurs en acides aminés dans les cultures des deux souches de Fmed et de Tver BRFM1532 (proline en présence des deux espèces, arginine en présence de Fmed phco36 et valine de Tver BRFM1532) suggèrent une métabolisation de ces derniers par le champignon. Leurs augmentations (dont l'aspartate en présence de Fmed uniquement et l'asparagine en présence de Tver BRFM1532), suggèrent des activités de recyclage ou de dégradation des protéines du substrat (Mandujano-González et al., 2016). Cette hypothèse est renforcée par la présence de protéases dans le sécrétome des deux espèces. L'étude plus précise de la nature et de l'activité de ces protéases permettrait de mieux comprendre les mécanismes mis en place.

Au contraire, des différences observées entre les deux espèces suggèrent que ces caractères soient spécifiques à Fmed et puissent être impliqués dans son adaptation. Parmi ces caractères, (i) les taux maximaux de minéralisation du carbone des deux souches de Fmed sont inférieurs à ceux des deux souches de Tver sur hêtre et sur vigne, (ii) la perte de masse des cultures sur sciure de vigne est inférieure à celle des cultures de Tver BRFM1532 dès le premier mois et jusqu'à 1,6 fois après trois mois, (iii) la teneur en ergostérol dans le mycélium seul et dans les conditions appliquées est supérieure à celle de Tver BRFM1532, (iv) le sécrétome est différent, conformément aux données de génétiques, et (v) une augmentation de la proportion en composés solubles (+9%) dans la sciure de vigne a été observée uniquement dans les cultures de Tver. Cette augmentation peut être due soit à l'accumulation de produits de dégradation du bois, soit à la production de mycélium. La première hypothèse est suggérée par la faible proportion du mycélium de Tver (22%) retrouvée dans la partie soluble lors des analyses de fibres du bois, mais une quantification plus précise de la biomasse fongique est nécessaire. La nature des enzymes identifiées est cohérente avec les données de génomique (Floudas et al.,

2012). La majorité des oxydoréductases sécrétées par les deux souches de Tver sont des LiPs. Des DyPs sont également sécrétées, et relativement peu de laccases (1%). Ces différences ne sont pas associées à une meilleure détoxification par Fmed que par Tver, ni à une plus forte perte de masse globale. Les conditions de l'expérience ont donc permis de mettre en évidence des caractères de Fmed différents de Tver, bien qu'ils ne soient pas associés à un net avantage de Fmed à dégrader le bois de vigne par rapport à Tver.

Il est possible que les différences observées entre Fmed et Tver confèrent à Fmed un avantage dans sa niche écologique, bien que cela ne puisse être mis en évidence dans les conditions de l'expérience. Par exemple, des différences morphologiques et de composition du mycélium peuvent jouer un rôle important. Les teneurs en ergostérol obtenues dans le mycélium de Tver (33 ng/mg sec) sont légèrement supérieures à des teneurs rapportées dans du mycélium obtenu après 4 et 8 semaines de culture en présence de bois de bouleau, respectivement de 2 à 13 et de 6 à 16 mg/g sec (Eikenes et al., 2005). Elles sont inférieures d'un facteur 10 à celles de Fmed, pour lequel les valeurs obtenues pour les deux souches sont similaires. Aucune étude rapportant les teneurs en ergostérol dans du mycélium de Fmed n'a été trouvée. Il est important de rappeler ici que les conditions physiologiques de croissance du mycélium ont pu avoir une influence sur la teneur en ergostérol du mycélium (Bermingham et al., 1995). Les résultats permettent donc uniquement de donner une estimation de la biomasse fongique, comparable uniquement par espèce fongique et par substrat. Il serait intéressant de comparer la méthode utilisée avec d'autres méthodes de quantification possibles, telles que le dosage de chitine, ou la quantification par qPCR, grâce à des marqueurs génétiques spécifiques (Pollastro et al., 2001; Eikenes et al., 2005). Les données de répartition des mycéliums de Fmed et Tver permettent également de différencier les types de morphologies adoptées par les deux champignons. La répartition du mycélium de Tver à 50% parmi les hémicelluloses suggère une composition plus riche en polysaccharides tels que la chitine ou des β -(1,3) glucanes ramifiés (Gow et al., 2017). Une variation de la composition du mycélium ou de sa densité peut avoir un impact sur le comportement physiologique du champignon, et être un facteur d'adaptation à un substrat. En effet, la composition du substrat exerce une influence sur l'épaisseur de la paroi cellulaire fongique et de la gaine de l'hyphe, celle-ci augmentant sur un milieu minimal ou à l'inverse excessivement riche (Klein et al., 2014). Les auteurs ont émis l'hypothèse que de telles modifications morphologiques pourraient jouer un rôle dans la sécrétion et le transport d'enzymes de dégradation du bois. Les différences morphologiques observées entre Fmed et Tver pourraient donc jouer un rôle dans l'adaptation de Fmed au bois de vigne.

3. Conclusion du chapitre 1

Dans ce chapitre, nous avons observé que deux souches de Fmed, issues de bois de vigne, sont capables de dégrader le bois de vigne et de hêtre sous forme de sciure, et pas ou très peu de la sciure d'épicéa. Les allures des taux de minéralisation du carbone des deux souches de Fmed, stables sur vigne et baissant en fin de culture sur hêtre, ainsi que la perte de masse supérieure sur vigne comparée à celle sur hêtre en présence de Fmed phco36, suggèrent une préférence de cette espèce pour ce substrat. Les analyses protéomiques ont montré des différences spécifiques entre Fmed et le modèle de pourriture blanche Tver concernant la nature des protéines sécrétées, de façon cohérente avec les données génomiques disponibles. Les oxydoréductases sécrétées par Fmed sont majoritairement des MnPs et des laccases, alors que Tver sécrète majoritairement des LiPs, et plus minoritairement des MnPs, des laccases et des DyPs. Cependant ces différences ne sont pas associées à une dégradation du bois ou à une détoxification plus efficace pour Fmed. Les deux souches de Fmed ont entraîné une perte de masse moyenne de 22% sur sciure de vigne, ce qui est équivalent à la perte de masse entraînée par une des souches de Tver, et inférieure à celle entraînée par l'autre souche. Dans les cultures de cette dernière et des deux souches de Fmed, des variations similaires des teneurs en acides aminés et une dégradation de l'ensemble des extractibles sélectionnés, des stilbènes et des flavonoïdes, sont observées. Une augmentation de la teneur en ergostérol dans les cultures sur sciure de vigne et de hêtre est observée pour chacune de ces cultures. Les deux espèces sont donc capables de croître sur ces substrats, ainsi que de les dégrader et de les détoxifier dans les conditions de l'expérience. De plus, pour les deux espèces et sur les deux substrats dégradés, un schéma de dégradation de type simultané a été montré. Ces observations suggèrent qu'au vignoble, d'autres facteurs que la composition du bois de vigne sont nécessaires pour expliquer la prévalence de Fmed dans l'amadou, l'un des principaux symptômes de l'Esca. Parmi ces facteurs, la structure tridimensionnelle du bois peut jouer un rôle sur la capacité d'un champignon dégradeur de bois à le dégrader (Blanchette, 1991; Pacetti et al., 2022). La réduction en sciure du bois dans cette expérience a pu faciliter l'accès aux polymères et favoriser Tver par rapport à Fmed sur bois de vigne. Par ailleurs, le bois de vigne vivant est capable de répondre à une agression extérieure telle que l'attaque d'un agent pathogène, notamment en synthétisant davantage ou *de novo* des métabolites spécialisés ou extractibles (Rusjan et al., 2017; Chervin et al., 2022). Les concentrations et la nature des extractibles présents alors dans le bois peuvent être différentes et l'étude de la capacité de Fmed à détoxifier ce substrat est une des pistes à explorer afin de mieux comprendre ses mécanismes d'adaptation.

Transition

La présence de Fmed sur sciure de bois de vigne entraîne une perte de masse plus importante que sur sciure de bois de hêtre ou d'épicéa. Fmed est de plus capable de dégrader l'ensemble des extractibles mesurés dans les précédentes expérimentations. Aucun avantage adaptatif à la sciure de bois de vigne par rapport à l'autre champignon de pourriture blanche Tver utilisé comme modèle, c'est-à-dire aucune spécificité substrat-champignon qui lui permettrait de se développer davantage ou de dégrader davantage de bois, n'a cependant pu être mise en évidence. L'hypothèse à explorer à présent est donc qu'un ou plusieurs autre(s) facteur(s) favorise(nt) sa croissance dans sa niche écologique, où le substrat est le bois de vigne.

La structure tridimensionnelle du bois peut jouer un rôle dans la durabilité du bois et la capacité des champignons dégradateurs de bois à se développer. En effet, les taux de dégradation observés sur le même cultivar de vigne ('Gewurztraminer') exposé 3 mois aux mêmes souches de Fmed (phco36 et LR124) étaient inférieurs pour des bûchettes (resp. 10 et 17% environ) que dans nos expériences avec de la sciure (resp. 24 et 22%) (Pacetti et al., 2022). Un tel effet peut être dû à différents facteurs, tels que la densité (Perrot et al., 2020), mais aussi l'accessibilité des polymères structuraux du bois ou la localisation des extractibles. Ce facteur sera donc pris en compte dans le deuxième chapitre.

Un autre trait des champignons dégradateurs de bois, peu exploré lors du chapitre précédent, est la production de métabolites spécialisés (SM). Les SM sont par définition des métabolites qui ne sont pas impliqués dans les fonctions primaires (respiration, nutrition, croissance) de l'organisme qui les produit. Ils sont produits par la plupart des organismes vivants, y compris les plantes et les champignons, et ont des rôles variés. Les extractibles par exemple font partie des SM. Les SM produits par les champignons peuvent avoir un rôle de signal, de réponse au stress (pigments par exemple) (Idnurm et al., 2005), d'assimilation de nutriments (sidérophores par exemple) (Scharf et al., 2014), ou encore un effet toxique envers les plantes (phytotoxines, petits facteurs de virulence) ou les animaux (mycotoxines) dans le cas des champignons pathogènes (Bills et al., 2016). Au moins 30 000 SM différents ont été isolés de champignons en 2010 et la plupart reste sans doute à découvrir (Bérdy, 2012; Schueffler and Anke, 2014). Ils font partie des familles chimiques des polycétides (lipides, terpénoïdes), des peptides non-ribosomiaux et de leurs dérivés, ou de formes hybrides entre ces familles, et plus rarement des alcaloïdes (les seuls connus étant les alcaloïdes de l'ergot) (Keller et al., 2005). Fmed est capable de produire *in vitro* deux SM, le 4-hydroxybenzaldehyde et le 6-formyl-2,2-diméthyl-

4-chromanone, qui ont des activités phytotoxiques (Wagschal et al., 2008; Andolfi et al., 2011). La production éventuelle de SM fongiques en fonction du substrat sera étudiée dans le 2^{ème} chapitre.

L'objectif principal de cette thèse, c'est-à-dire étudier l'adaptation de Fmed à son substrat, en recherchant des spécificités hôte-champignon, sera poursuivi dans ce second chapitre. Deux principales pistes seront explorées : (i) étudier l'impact de la structure tridimensionnelle du bois sur le comportement de Fmed, en comparant différents bois sous forme de bûchettes et en utilisant à nouveau Tver comme modèle de pourriture blanche ; (ii) explorer sans *a priori* la composition métabolomique du substrat, colonisé ou non par le mycélium, et du mycélium, afin d'observer d'une part l'évolution des SM du bois (extractibles), et d'autre part la présence et l'évolution de SM fongiques. L'article présenté dans le chapitre 2 est en cours de rédaction et certains aspects seront enrichis avant sa soumission. Notamment, les données brutes des analyses métabolomiques seront ajoutées sous forme de tableaux complémentaires, certaines annotations de métabolites pourront être approfondies, et surtout, des analyses protéomiques des sécrétomes de Fmed et Tver dans les bûchettes ont également été réalisées dans le cadre de cette expérience, dont les résultats ne sont pas encore disponibles.

Chapitre 2 : Mécanismes de dégradation du bois par *F. mediterranea* sur différentes essences de bûchettes de bois

1. Etude de la dégradation du bois de vigne, hêtre et chêne en bûchettes par *F. mediterranea* grâce aux réseaux moléculaires (Publication n°3)

Publication n°3: Schilling, M., et al. (*in progress*). Wood degradation by *Fomitiporia mediterranea* M. Fischer: exploring fungal adaptation with metabolomic networking.

1 Article

2 Wood degradation by *Fomitiporia mediterranea* M.
3 Fischer: exploring fungal adaptation with metabolomic
4 networking

5 Marion Schilling¹, (...), Sibylle Farine³, Eric Gelhaye¹

6 ¹ Université de Lorraine, INRAE, IAM, Nancy, France.

7 ³ Laboratoire Vigne Biotechnologies et Environnement UPR-3991, Université de Haute-
8 Alsace, 33 rue de Herrlisheim, 68000 Colmar, France

9 **Abstract:** *Fomitiporia mediterranea* M. Fischer (Fmed) is a white-rot wood-decaying
10 fungus associated with one of the most important and challenging diseases in
11 vineyard, Esca. To relieve from microbial degradation, woody plants including *Vitis*
12 *vinifera* use structural and chemical weapons. Lignin is the most recalcitrant of the
13 wood cell wall structural compounds and contributes to wood durability. Extractives
14 are constitutive or *de novo* synthesized specialized metabolites, not covalently bound
15 to wood cell walls, often associated with antimicrobial properties. Fmed is able to
16 degrade lignin and to detoxify wood toxic extractives, namely thanks to enzymes
17 such as laccases and peroxidases. Grapevine wood chemical composition could be
18 involved in Fmed adaptation to its substrate. This study aimed at deciphering if
19 Fmed uses specific mechanisms to degrade grapevine wood structure and
20 extractives. Three different wood species: grapevine, beech, and oak were exposed to
21 fungal degradation by two Fmed strains. The well-studied white-rot fungus *Trametes*
22 *versicolor* (Tver) was used as a comparison model. A simultaneous degradation
23 pattern was shown for Fmed on the three degraded wood species. Wood mass loss
24 after 7 months for the two fungal species was at highest with low-density oak wood.
25 For the latter wood species, radical differences upon wood initial density were
26 observed. Higher degradation rate on grapevine wood, and lower on beech wood,
27 were observed with one Fmed strain compared to Tver. However, no significant
28 fungal-substrate species specificities could be highlighted due to high intraspecific
29 variability and samples heterogeneity. Non-targeted metabolomic analysis
30 highlighted chemical specificities upon wood species for wood extracts and upon
31 fungal species for mycelium extracts. Metabolites were annotated using Metabolomic
32 Networking and public databases (GNPS, MS-DIAL). Chemical differences between
33 non-degraded and degraded woods, and between mycelia grown with or without
34 wood, are discussed. This study highlights some Fmed metabolomic specificities
35 during wood degradation, and thus contributes to better understand its wood
36 degradation mechanisms.

37 **Keywords:** *Fomitiporia mediterranea*; *Trametes versicolor*; adaptation; white rot;
38 molecular network; grapevine wood; Esca

39

40 **1. Introduction**

41 Eutypiose, Black Dead Arm and Esca are the three main grapevine
42 trunk diseases worldwide, causing up to 50 % of vineyards production and
43 more than 1.6 billion dollars economical loss [1]. One of the Esca typical
44 symptoms is white-rot in the trunk, also called *amadou* [2]. In Europe,
45 *Fomitiporia mediterranea* M. Fischer (*Basidiomycota*, *Hymenochaetaceae*) (Fmed)

46 is the main fungal species identified in *amadou* [3–5]. Fmed is a wood-
47 decaying fungus, classified as a white-rot, as it is able to degrade all wood
48 structural compounds, including lignin, the most recalcitrant one [6].
49 Despite no true evidence of Fmed pathogenicity *stricto sensu* on grapevine,
50 Fmed abundancy in grapevine wood was correlated with Esca foliar
51 symptoms *in vivo* [7].

52 Few studies also reported Fmed presence on other hardwood species
53 [5], such as oak wood [8] and on beech wood [8]. However, its large presence
54 in vineyard suggest that its molecular mechanisms are specifically adapted
55 to degrade grapevine wood. Indeed, wood-decaying fungi might be well
56 adapted to their substrate. They developed specific degradation mechanisms
57 namely upon wood chemical and anatomical traits. Grapevine wood
58 chemical and structural composition shows specificities compared to forest
59 tree woods [9].

60 Wood degradation involves wood structural compounds degradation,
61 *i.e.* hemicelluloses, cellulose and lignin. Moreover, in response to microbial
62 attack, grapevine wood is able to produce or accumulate Specialized
63 Metabolites (SMs), also called phytoalexins, involved in its defense reaction
64 against pathogens such as fungi [10,11]. In wood, SMs are parts of the
65 extractives, *i.e.* all molecules not physically bound to wood cell wall
66 polymers and extractible with solvents [12]. These extractives belong to
67 diverse chemical families such as stilbenes, terpenes, flavonoids or tannins
68 [13] [14], the most represented in grapevine wood being the stilbenes. To
69 counteract with extractives, wood-decaying fungi such as Fmed are able to
70 detoxify them, by degrading or modifying them chemically [15]. More
71 specifically, Fmed was shown to degrade extractives in grapevine and beech
72 wood reduced into sawdust *in vitro*, *i.e.* stilbenes and flavonoids [16]. Fmed
73 degradation mechanisms for those extractives remain unknown but could
74 involve extracellular laccases or peroxidases. Fmed laccase has been shown
75 to degrade resveratrol, the main grapevine stilbene monomer, and to
76 oxidize, dimerize or modify stilbenes [17–20]. It is not known whether Fmed
77 uses specific detoxification mechanisms depending on its woody substrate
78 or not.

79 Fungi as well can produce SMs, which play crucial and diverse roles in
80 survival functions such as pathogenicity [21], stress response [22], micro-
81 nutrients availability [23], or signaling. According to their involvement in
82 environmental stress response, fungal SMs are often not produced by fungi
83 under laboratory growth conditions. However, *in vitro* cultures with plant-
84 derived media were shown to promote fungal SMs production [24]. Fmed
85 was shown to produce SMs with phytotoxic activities *in vitro*, the 4-
86 hydroxybenzaldehyde and the 6-formyl-2,2-dimethyl-4-chromanone,
87 isolated during Fmed growth on carrot broth [25]. Their role in Fmed growth
88 and pathogenicity *in vivo* is unknown, and such fungal SMs in wood
89 colonized by Fmed were never reported in vineyard.

90 Non targeted metabolomic analysis using molecular networking were
91 successfully used to investigate both wood and fungal SMs [26,27].
92 Molecular networking was first introduced in 2012 [28] and is a tool using
93 tandem mass spectrometry (MS/MS) to visualize the diversity of a complex
94 mixture of metabolites. Similar methodologies were already used mainly for
95 protein annotation and pathways identifications, for example with the open-
96 source software Cytoscape [29]. The principle relies on the fact that two
97 compounds that have similarities in their structure will have common
98 fragment ions and/or shift between their parent and fragment ions [30].
99 MS/MS spectra are compared using their cosine score and a clustering
100 algorithm [31]. The cosine score indicates the degree of similarity between

101 two MS/MS spectra, considering their parent and fragments ions m/z and
 102 intensities [30]. Global Natural Products Social Molecular Networking
 103 (GNPS, <https://gnps.ucsd.edu/>) is a community providing tools and sharing
 104 databases for molecular network analyzes and annotations [32]. The open-
 105 source software MetGem (<https://metgem.github.io>) is an interface to apply
 106 this method and use the available databases [33]. MetGem proposes not only
 107 the molecular network visualization but also the *t*-distributed Stochastic
 108 Neighbor Embedding (*t*-SNE) algorithm, which preserves distances between
 109 clusters among other advantages [33]. This method was successfully used
 110 for the characterization of new metabolites from microorganisms with the
 111 help of complementary techniques such as nuclear magnetic resonance
 112 [26,27].

113 The aim of this study is to describe Fmed metabolism depending on the
 114 presence of different wood species, and how the fungus affects wood
 115 structural and chemical composition. Thus, wood degradation rates and
 116 fungal biomass production on different woody substrates will be compared,
 117 and wood fibers analyses, proteomics and non-targeted metabolomics with
 118 molecular networking will be used to investigate molecular mechanisms.
 119 The well-studied white-rot fungus *Trametes versicolor* (L.) Lloyd
 120 (*Basidiomycota*, *Polyporaceae*) (Tver) will be used as a comparison model to
 121 highlight fungal-substrate specificities.

122 2. Material and methods

123 2.1. Fungal cultures

124 Fmed strains phco36 and LR124 were provided by the Laboratoire
 125 Vigne Biotechnologies et Environnement (LVBE) of the University of Haute-
 126 Alsace in Colmar and isolated respectively from *Vitis vinifera* L. cultivar
 127 (cv.) ‘Ugni blanc’ in 1996 in Saint-Preuil (Charente, France) and from *V.*
 128 *vinifera* L. cv. ‘Carignan’ in 1996 in Villeneuve-lès-Maguelone (Hérault,
 129 France). Tver strain BRFM1532 was isolated from *Fagus* sp. dead wood in
 130 France and obtained from the Centre International de Ressources
 131 Microbiennes (CIRM) catalogue. For each strain, four 0.5cm³ inocula were
 132 inoculated on 50mL Malt-Agar medium (20g/L) in 175cm² cell culture flasks
 133 at 25°C. After 2-weeks, three wood blocks per flask were added on the
 134 mycelium. Five flasks for each wood species (beech, oak and grapevine) on
 135 each fungal strain (two Fmed strains, one Tver strain) were cultured at 27°C
 136 for 7 months. Oxygen in these 45 flasks was renewed once a week by opening
 137 the flasks under sterile conditions for one hour. Three flasks for each wood
 138 species on each fungal strain, and one flask with each fungal strain without
 139 wood (for control mycelium), were cultured at 25°C for 4 months. Oxygen
 140 in these 30 flasks was renewed constantly through filtering caps and
 141 humidity was maintained at 80%. Mycelia collected after 7 months were
 142 lyophilized and weighed for fungal biomass estimation.

143 2.2. Wood material

144 Beech (*Fagus sylvatica*) and oak (*Quercus robur*) wood blocks were
 145 provided by the Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers (BEF) laboratory
 146 (INRAE, Champenoux) from healthy sapwood of trunks from Champenoux
 147 forest (Meurthe-et-Moselle, France). Entire vines of *V. vinifera* cv. ‘Riesling’
 148 were cut in Orschwihr vineyard in Haut-Rhin (Alsace, France) in February
 149 2021, and stored at room temperature before being sawn into wood blocks.
 150 White parts of the vine trunk, considered as healthy, were selected as much
 151 as possible. For each wood species, wood blocks of approximately
 152 1.25x5x1cm were sawn, dried 48hours at 105°C, individually identified,

153 measured (length, width and height), and weighed. Initial wood density was
 154 obtained for each wood block by the following equation:

$$155 \text{ wood block density} = \frac{\text{wood block dry weight (g)}}{\text{wood block volume (cm}^3\text{)} \times \text{water volumic mass}} \quad (1)$$

156 where density is a dimensionless value and water volumic mass equal to 1.00
 157 g/cm³.

158 *Mycelia* and degraded wood blocks were collected separately firstly after 4
 159 months for proteomic, metabolomic analysis and wood fibers analysis, and
 160 secondly after 7 months for wood mass loss, fungal biomass estimation and
 161 wood fibers analysis. To measure wood mass loss, wood blocks collected
 162 after 7 months were dried 48 hours at 105°C and weighed.

163 2.3. Wood fibers analyses

164 Wood fibers analyses were performed by ASIA platform (Université de
 165 Lorraine-INRAE; <https://a2f.univ-lorraine.fr/en/asia-2/>). Dried wood blocks
 166 collected after 4 and 7 months of culture were grown into powder by liquid-
 167 nitrogen assisted cold ball grinding (Cryomill® Bertsch, ASIA, A2F) and
 168 pooled by strain and wood species. Lignin, cellulose, hemicelluloses, and
 169 soluble compounds contents were quantified as described previously [16],
 170 using a protocol adapted from Van Soest and McQueen [34].

171 2.4. Ethyl acetate extraction and LC-MS/MS analysis

172 Wood blocks and mycelium from 4-months culture flasks were dried 48
 173 hours at 35°C before being ground by liquid-nitrogen assisted cold ball
 174 grinding (Cryomill® Bertsch, ASIA, A2F) for ethyl acetate extraction. The
 175 powder was extracted at ratio 100 mg/2 mL with ethyl acetate by 24 hours
 176 maceration at room temperature, under dark conditions and at 60 rpm.
 177 Samples were centrifugated at 13400 rpm and supernatant was collected,
 178 dried at room temperature and weighed. Methanol was added to resuspend
 179 dried extracts at 1 mg/mL. Samples in methanol were additionally
 180 centrifugated at 13400 rpm and supernatant was collected, dried at room
 181 temperature and weighed. Methanol was used to resuspend dried extracts
 182 at 1 mg/mL for HPLC-MS/MS analysis. HPLC-MS/MS analysis were
 183 conducted at ICSN mass spectrometry laboratory with Agilent HPLC-
 184 QTOF-ESI-MS/MS in positive ionization mode.

185 2.5. HPLC-QTOF-ESI-MS/MS analysis

186 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was performed
 187 with an Agilent chain with an Accucore Thermofisher C18 column (100mm
 188 x 2.1 mm x 2.6 µm). Oven temperature was set at 45°C. A volume of 5 µL per
 189 sample was injected and mobile phase was composed of A: water acidified
 190 with formic acid at 0.1% and B: acetonitrile with formic acid at 0.1%.
 191 Gradient was performed at 4mL/min with 95% A to 0%A in 20min then
 192 maintained 3min, followed by an equilibration step with 95%A in 1min then
 193 maintained 4min. MS/MS detection was performed with a Quadrupole
 194 Time-of-Fly (QTOF) fragmentor by dual ElectroSpray Ionisation (ESI) at
 195 20eV in positive mode and in Data Dependent Analysis (DDA) mode with
 196 following parameters : absolute threshold was set at 5 and retention time
 197 threshold at 0.01; MS mass-to-charge ratio (*m/z*) ranged from 100 to 1700 and
 198 MS/MS *m/z* ranged from 50 to 1700. To avoid contaminants interferences and
 199 technical issues, ions with following *m/z* were excluded from MS/MS
 200 fragmentation: 279.0944; 121.9906; 622.0290 ; 922.0098 ; 228.1955, 338.3414.

201 2.6. Network metabolomic analyses

202 MSconvert software belonging to Proteowizard package [35] was used
 203 for data conversion from Agilent constructor format to mzML files. Data
 204 pretreatment was done with MZMine2.53 software [36] with following
 205 parameters: mass detection noise level was set to 1000 for both MS and
 206 MS/MS m/z ; chromatogram building was achieved with Automated Data
 207 Analysis Pipeline (ADAP) chromatogram builder algorithm [37] with a
 208 minimum of 3 scans per group, a minimal intensity of 10000 and m/z
 209 tolerance at 0.005 (or 10 ppm); chromatogram deconvolution was achieved
 210 with ADAP wavelets algorithm [37] with following parameters : signal/noise
 211 threshold 20, minimum feature height 10000, coefficient threshold 10, peak
 212 duration range between 0.00 and 1, retention time (RT) wavelet range from
 213 0.02 to 0.09, m/z center calculated as median, m/z range for MS/MS 0.1 and
 214 RT range for MS/MS 0.2. Chromatograms were deisotoped with isotopic
 215 peak grouper algorithm with a m/z tolerance at 0.005 or 10 ppm, and a RT
 216 tolerance at 0.1min. Peak alignment was performed using Join Aligner
 217 method with m/z tolerance at 0.005 or 10 ppm, m/z weight set at 80% and RT
 218 tolerance at 0.1 min. Aligned chromatograms metadata were used for
 219 statistical analyses first with all MS features. Then, MS/MS data were then
 220 filtered, and chromatograms and metadata with only MS/MS data were
 221 exported to GNPS compatible mgf and csv files. Files were processed with
 222 MetGem 1.3.6 software [33,38] (<https://metgem.github.io/>) with following
 223 parameters: m/z tolerance was set at 0.04 and a minimum of 2 matched peaks
 224 was set for similarity between two nodes. All peaks in a +/-17 Da window
 225 around the m/z precursor were removed. Only peaks above 1% of the highest
 226 or the six highest peaks in a +/-17 Da window throughout the spectrum were
 227 kept. t -SNE visualization was constructed with following parameters: at
 228 least 1 cosine score above 0.75 was requested. Number of iterations,
 229 perplexity, learning rate and early exaggeration were set to 10000, 6, 10 and
 230 12 respectively. To cope with the high number of MS/MS features, Barnes-
 231 Hut approximation angle was used and set at 0.7. Annotations were
 232 performed with GNPS (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/libraries.jsp>) and
 233 MS-DIAL (<http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/main.html#MSP>)
 234 public standards databases.

235 2.7. Glutathione Transferase (GST) thermal stability assay

236 Fungal GSTs are intracellular enzymes involved in detoxification by
 237 white-rot fungi [15]. Interactions between fungal GSTs and extractives can
 238 be used as an indicator of wood durability [39]. Thus, interaction potential
 239 of the metabolites found in wood blocks or in mycelia was investigated with
 240 ThermalShift Assay© (TSA). TSA is based on the capacity of GSTs to bind
 241 SYPRO orange stain only once they are denaturated, thus exposing a binding
 242 site. Once SYPRO is bound to the GST, fluorescence is emitted, which is used
 243 as an indicator of GST denaturation. For each of the 60 samples described
 244 above (wood and mycelium extract), 11 μ L of Tris-HCl 150mM pH 8.0 buffer,
 245 5 μ L of ultra-pure water (Millipore©, Merck™), 5 μ L of GSTO2S purified
 246 from *Trametes versicolor* cultures at final concentration of 20 μ M, 2 μ L of
 247 SYPRO orange diluted at 1.25%, and 2 μ L of extract at initial concentration of
 248 10mg/mL in DMSO (or 2 μ L of DMSO only for control wells) were added in
 249 one well of a 96-well microplate, on ice and in triplicate. Microplates were
 250 spinned at 2000rpm and placed into a Bio-Rad ThermalCycler CFX Opus
 251 96©. ThermalCycler temperature was controlled by BioRad CFX Maestro
 252 software and set to increase from 5°C to 95°C at 5°C/min in 2 hours.
 253 Fluorescence was measured continuously at excitation 485nm and emission
 254 530nm with HEX fluorochrome. The denaturation temperature,
 255 corresponding to the temperature where 50% of the highest fluorescent is

256 measured, was obtained by calculating the derivate of the curve of
 257 fluorescence as a function of the temperature. The temperature where the
 258 most extreme value (a negative value) of this derivate was achieved
 259 corresponds to the denaturation temperature. Denaturation temperatures
 260 were then expressed as a thermal shift (ΔT) corresponding to the difference
 261 between the observed denaturation temperature and the control
 262 denaturation temperature (with DMSO only).

263 2.8. Statistical analyses

264 Data analyses were done using Rstudio, PBC software version
 265 2022.02.3. Shapiro-Wilk test was used for data normality check when
 266 relevant. Kruskal-Wallis with Nemenyi Tukey multi-paired comparison test
 267 was used for nonparametric tests and Student Newman-Keuls (SNK-test)
 268 with Tukey multi-paired comparison test for parametric tests. Significant
 269 differences are indicated by *** for p-values < 0.001, ** for p-values < 0.005
 270 and * for p-values < 0.05. Principal Component analysis (PCA) on the MS
 271 and MS/MS features obtained after MZMine2 pretreatment was conducted
 272 with Rstudio and Factoshiny package, and heatmaps were constructed with
 273 Rstudio.

274 3. Results

275 3.1. Mass loss and mycelium growth

276 Two Fmed strains (phco36 and LR124) and one Tver strain (BRFM1532)
 277 were grown for 4 and 7 months on malt-agar (MA) or on MA with either
 278 grapevine cv. 'Riesling', oak or beech wood blocks. Few morphological
 279 differences between Fmed *mycelia* upon their substrates were observed
 280 (Figure 1). Mycelia were all yellowish to brownish and cottony. They were
 281 darker for both strains on cultures with beech wood blocks after 4 months,
 282 but no differences anymore were observed after 7 months. Few differences
 283 were observed as well between Tver mycelia. All mycelia were white and
 284 less voluminous than Fmed mycelia after both 4 and 7 months. Those
 285 observations are consistent with a previous study conducted on wood
 286 sawdust [16]. Fungal biomass was collected after 7 months of culture,
 287 separated from wood blocks, lyophilized, and dry weighed (Figure 2). With
 288 grapevine wood, Fmed LR124 produced more biomass than with oak (p-
 289 value 0.016), and more than Tver BRFM1532 with grapevine wood (p-value
 290 0.016). A high variability was observed between replicates, and a tendency
 291 to more fungal biomass for Fmed phco36 with grapevine than with beech or
 292 oak and compared to Tver with grapevine was observed.

293 All wood blocks were individually measured (length, width, and
 294 height), dried for 48 hours at 105°C and weighed before fungal cultures.
 295 Initial dry weight was used to calculate dry wood initial density. After seven
 296 months of exposure to fungal culture, wood blocks were sampled, separated
 297 externally from mycelium, dried for 48 hours at 105°C and weighed to
 298 calculate wood mass loss in percent of initial dry weight (Figure 3).
 299 Regarding oak wood mass losses, two groups were distinguished for all
 300 strains: one group with a high mass loss ("D+": 54 to 64%) and one group
 301 with a low mass loss ("D-": 9 to 16%). Interestingly, the two groups
 302 correspond respectively to wood blocks with lower initial density (<0.60)
 303 and to higher initial density (>0.60) (Supplemental data Figure S1). This was
 304 not observed for the two other wood species, despite various initial
 305 densities, ranging from 0.53 to 0.84 for grapevine wood and from 0.59 to 0.75
 306 for beech wood blocks (Figure S1).

307 Parallely, mass losses for grapevine wood blocks exposed to Fmed
 308 LR124 and Tver showed high variability, contrary to Fmed phco36, with no
 309 relation to initial wood density (Figure 3 and Figure S1). After exposure to
 310 Fmed phco36, the highest mass loss was observed with oak wood (group
 311 “D+”: 56%), then with grapevine wood (43%) and finally beech wood (36%).
 312 After exposure to Fmed LR124, mass losses were similar for all wood species
 313 (44 to 56%). After exposure to Tver, the highest mass loss was observed on
 314 oak wood (group “D+”: 64%) and was similar to those on oak wood after
 315 exposure to both Fmed strains. Beech wood mass loss was higher than
 316 grapevine wood mass loss after exposure to Tver, and higher than after
 317 exposure to Fmed phco36. On the contrary, grapevine wood mass loss was
 318 lower than after exposure to Fmed phco36.

319 3.2. Wood fibers analyses

320 Wood blocks proportions in lignin, hemicelluloses, cellulose and
 321 soluble compounds were obtained by Van Soest method [34] for each wood
 322 species before culture (Figure 4). A similar amount of lignin (20 to 21%) was
 323 observed in all wood species. Grapevine wood contained respectively 34, 27
 324 and 18% of cellulose, hemicelluloses, and soluble compounds, whereas
 325 beech wood contained 45, 27 and 8% of each, and oak wood 42, 22 and 15%.
 326 Proportions of wood compounds were obtained by the same protocol after
 327 7 months of culture for each wood species and fungal strain. Mass loss or
 328 gain in each wood compounds are expressed in final/initial content ratio
 329 (Figure 5). A ratio of one means that no changes in compound content
 330 occurred while a ratio higher than one means an increase and conversely.
 331 After 7 months of exposure to the two Fmed strains, for all wood species, the
 332 proportions for each structural compounds (hemicelluloses, cellulose and
 333 lignin) were similar to the initial proportions. This is characteristic of a
 334 simultaneous degradation pattern [40]. On the contrary, soluble compounds
 335 content increased in grapevine wood exposed to the two Fmed strains and
 336 in beech wood with Fmed LR124 (ratios 1.5 to 1.7). After exposure to all
 337 strains, a decrease of soluble compounds content was observed in less
 338 degraded oak wood blocks (ratios 0.6 to 0.7).

339 A similar behavior for structural compounds is observed for Tver
 340 BRFM1532 on grapevine and on oak: no differences between each structural
 341 compounds proportions is observed, which is characteristic of a
 342 simultaneous pattern. A decrease in lignin content in beech wood is
 343 observed (ratio 0.5), which suggests a selective delignification in this case.
 344 No differences in soluble compounds contents in grapevine, beech and the
 345 more degraded oak wood blocks were observed.

346 3.3. Non-targeted metabolomic analysis

347 Sixty ethyl acetate extracts were obtained from 24 conditions: dried and
 348 ground wood blocks of each of the three wood species (grapevine, beech,
 349 oak), after 4 months of exposure to each of the three strains (Fmed phco36,
 350 Fmed LR124 or Tver BRFM1532), and each corresponding mycelium (18
 351 conditions) were extracted in triplicates (54 extracts). Nine dried, ground
 352 and pooled non-degraded wood blocks of each wood species (control wood)
 353 and mycelium of each fungal strain grown 4-months on malt-agar without
 354 wood (control mycelium) were extracted and used as control (6 extracts).
 355 HPLC-QTOF-ESI-MS/MS Data-Dependent Analyses (DDA) analyses were
 356 conducted in positive ionization mode and pretreated with MZMine 2.53
 357 [36]. After ADAP chromatogram construction and deconvolution [37],
 358 isotopic peaks grouping and peak alignment, 4190 MS features were

359 selected. Among them, 2812 features were found only in mycelia extracts
360 and 2268 only in wood extracts.

361 All obtained MS features were used for Principal Component Analysis
362 (PCA), first with all extracts (from both wood and mycelium samples) with
363 Quality control samples (QC) to check technical analysis quality
364 (Supplementary Material Figure S2a). QC were grouped together, which
365 demonstrates a good technical quality. PCA was then conducted on all
366 samples without QC and samples type (mycelium or wood extracts) were
367 statistically different on dimensions 1 (p-value 2.670E-04) and 3 (p-value
368 2,023E-08), which explain respectively 11.87 and 7.09% of total variance
369 (Supplementary Material Figure S2b). Regarding those dimensions, two
370 samples were far from their replicates: “R124M1” and in a lesser extent
371 “C124M3”, corresponding respectively to Fmed LR124 mycelium grown on
372 grapevine wood (replicate n°1) or on oak wood (replicate n°3). Those
373 samples will be considered carefully during further analyses.

374 PCA analyses were then conducted separately on wood samples only
375 or on mycelium samples only. Among wood samples, wood species were
376 significantly different on dimensions 2 (p-value 4.681E-02) and 3 (p-value
377 1.171E-03), explaining respectively 12.43 and 9.10% of total variance between
378 wood samples (Supplementary Material Figure S3). Noticeably, a higher
379 heterogeneity between oak and beech wood samples than between
380 grapevine wood samples was observed.

381 Among grapevine wood samples only (Figure 6a), statistical differences
382 were observed between fungal species (p-value 2.589E_05) and strains (p-
383 value 1.202E_04) on dimension 2, which explains 19.71% of total grapevine
384 wood samples variance. Figure 6a shows that this effect mainly separates
385 control wood from wood exposed to any of the three fungal strains or of the
386 two fungal species. Similar effects were observed for oak wood samples (p-
387 values resp. 3.587E-04 and 1.296E-03) on dimension 3, which explains 12.66%
388 of total oak wood samples variance (Figure 6b), and for beech wood samples
389 regarding dimension 4 (Figure 6c). Among all grapevine wood samples, 588
390 of the total selected MS features were found, 69 of the latter were found only
391 in control wood and 7 in all samples after exposure to fungal strains but not
392 in control wood (Figure 7). Consistently with PCA analysis, hierarchical
393 clustering separated control wood from wood exposed to fungal species, and
394 few differences between grapevine wood samples after exposure to each
395 fungal strain or species were observed.

396 PCA analysis on mycelium samples showed statistical differences
397 among fungal species and strains on dimensions 1 (p-values resp. 2.872E-02
398 and 1.074E-02) and 2 (p-values resp. 1.146E-06 and 8.037E-06), which explain
399 respectively 17.50 and 11.27 % of total mycelium samples variance (Figure
400 S4a). As only Tver BRFM1532 was graphically separated from the two Fmed
401 strains, the two Fmed strains will not be distinguished for further analyses.
402 Noticeably, the sample “R124M1” was far from its replicates, particularly on
403 dimension 1, and should be considered carefully. Interestingly, mycelia were
404 statistically different upon the wood species on which they were grown on
405 (p-value 2.344E-03) on dimension 3, which explains 7.15% of total mycelium
406 samples variance (Figure S4b).

407 In order to highlight Fmed mycelium metabolomic changes depending
408 on its substrate, relative abundancies of Fmed mycelium significantly
409 different metabolites between mycelium grown either with grapevine or
410 beech wood (851 MS features, Figure S5a), or with grapevine or oak wood
411 (796 MS features, Figure S5b) were represented with hierarchical clustering.
412 As observed with PCA analyses, a high heterogeneity between replicates
413 was observed.

414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436

437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467

3.4. Molecular networking

Molecular networking, using MS/MS data, is a non-targeted method enabling features annotation with relative accuracy. During DDA analysis, each 0.01 min, the 5 most intense MS peaks were fragmented. Thus, MS/MS data are available only for some of the previously selected MS features. Consequently, the latter were filtered with MZMine 2.53 [36] to keep only features with MS/MS data. This led to 3011 MS/MS features, among them 1000 were found only in wood samples, 1245 only in mycelium samples, and 760 in both.

The 3011 MS/MS features were mapped with *t*-SNE algorithm using MetGem software 1.3.6 [33,38] (Figure 8). In *t*-SNE graphical representation, each feature is represented by a “node”. The less distance there is between each node, the more similarities there is between MS/MS data of the corresponding features, and the more the latter are prone to share chemical structural characteristics. Nodes were gathered into 91 clusters with MetGem clustering algorithm set with a minimal of 5 features per cluster. As *t*-SNE algorithm has the particularity to keep distances between all nodes even between different clusters, it should be kept in mind that close clusters might gather features with some common or close structural characteristics. Annotation was achieved according to free GNPS and MS-DIAL databases, and match score (ms) was given as a confidence indicator. The closest to 1 is the ms, the more similarities there is between databases standards and experimental features.

3.4.1. Wood samples metabolome

As shown with descriptive statistical analysis (PCA and hierarchical clustering), the main differences between all samples were attributable to sample type, *i.e.* their woody or mycelium origin. Thus, wood samples and mycelium samples compositions will be described separately.

Among wood samples, wood species was the most discriminant factor (see 3.3). Wood species specific MS/MS features, *i.e.* all MS/MS features found only in one of each wood species were selected. Among the 211 grapevine wood specific features, 37 were found only in control wood, and 137 only after exposure to fungal degradation.

Differences between features found in grapevine wood samples after exposure to fungal degradation or not were observed. In grapevine control wood only, 6 features were mapped in clusters 11 to 14. Two of them were annotated with *in-silico* database (ISDB) as “compound 1”, with a structure close to *epsilon*-viniferin (ms 0.55 and 0.60, *m/z* 453.133, rt 5.5 and 6.3 min, cluster 14, Figure S6), and two others either as *s*-viniferin (ms 0.78, *m/z* 455.149, rt 5.7 min, cluster 13) or as an analog of the latter. Other features found only in grapevine control wood were annotated as coniferaldehyde (ms 0.94, *m/z* 179.0703, cluster 75), epicatechin (ms 0.93, *m/z* 291.086, noise), 3,4,5-trimethoxyphenol (ms 0.93, *m/z* 185.081, noise), syringaldehyde (ms 0.93, *m/z* 183.065, cluster 65) or 4-hydroxybenzaldehyde (ms 0.91, *m/z* 123.044, cluster 65).

In control grapevine wood and in grapevine wood exposed to Fmed only (*i.e.* not after exposure to Tver), 14 features were detected, among them 4 only found in grapevine wood. The latter were annotated among others as betulinic acid (ms 0.87, *m/z* 439.357, noise) and resveratrol (ms 0.86, *m/z* 229.086, cluster 71). Among features not specific to grapevine wood, some were namely annotated as glycerol-1-stearate (ms 0.94, *m/z* 359.316, cluster 10) or tripropylene glycol butyl ether (ms 0.86, *m/z* 249.206, cluster 35). Those features might have been degraded by Tver and not by Fmed. Conversely, 6 features were in control grapevine wood and after exposure to Tver, but not

468 after exposure to the two Fmed strains, suggesting that they were degraded
 469 by Fmed and not by Tver. Among them, 2 were found only in grapevine
 470 wood and were annotated as sumaresinolic acid (ms 0.62, m/z 455.352, noise)
 471 or as an analog to the compound KU036-11-7 (Figure S7, cluster 8). The
 472 others, not specific to grapevine wood, were namely annotated as analogs to
 473 a polyketide (Figure S8, cluster 30) or to neryl acetate (a monoterpene, Figure
 474 S9, cluster 33).

475 Features found in grapevine wood exposed to fungal degradation, and
 476 not in control grapevine wood, might be fungal metabolites or wood
 477 degradation products. Among them, 125 features were specific to Fmed on
 478 grapevine wood, *i.e.* found in grapevine wood samples only after exposure
 479 to Fmed, and not after exposure to Tver. Among them, 74 were found only
 480 in grapevine wood. They were annotated as: ceramides (cluster 4),
 481 stilbenoids (clusters 11 to 15), an acetophenone (cluster 44), 3-
 482 methylglutaconic acid (cluster 58), probably other phenolic compounds
 483 (cluster 61), 7,8-dihydroxy-4-methylcoumarin (cluster 75)
 484 hydroxybenzoylcholine (cluster 84), isoeleutherin and choline (cluster 89), or
 485 as analogs to diacylglycerol trimethylhomoserine (cluster 56).

486 Conversely, 95 features were found in grapevine wood exposed to Tver
 487 and not exposed to Fmed. Among them, 23 were found only in grapevine
 488 wood. They were annotated as stilbenes oligomers (clusters 14 and 15),
 489 pyrogallol (cluster 51), 13-keto-9Z,11E-octadecadienoic acid (cluster 60),
 490 gameXpeptide (cluster 66), loliolide (cluster 72), labdanediol (cluster 81) or
 491 methyl asterrate (cluster 86). Interestingly, few of them probably share
 492 common chemical structure with features specific to grapevine wood
 493 exposed to degradation by Fmed (belonging to clusters 14 and 15 namely).
 494 On the contrary, most of them probably belong to different chemical classes,
 495 as they were mapped in distinct clusters.

496 3.4.2. Mycelium samples metabolome

497 Considering mycelium samples, fungal species was the most
 498 discriminant factor, and differences among wood species were observed as
 499 well (see 3.3). Among the 2005 MS/MS features found in mycelium samples,
 500 541 were only in Fmed mycelium, and 418 only in Tver mycelium.

501 MS/MS features found in Fmed mycelium only are listed in
 502 Supplementary Material. Some of them (227 features) were found only in
 503 Fmed mycelium grown with grapevine wood, only with beech wood (213
 504 features) or only with oak wood (70 features). However, a high variability
 505 between individuals was observed. Only one feature was found in all
 506 individual Fmed mycelia grown with beech wood (m/z 491.097, rt 6.95 min,
 507 cluster 16). Regarding mycelia grown on grapevine wood, one sample
 508 (“R124M1”), accordingly to PCA analysis, was markedly different from the
 509 others, containing more features. Among the 227 features found only in
 510 Fmed mycelia grown on grapevine wood, 20 were found in at least two
 511 individuals. The latter were annotated as *allo*-protolichesterinic acid (m/z
 512 330.264, ms 0.68, cluster 83, Figure S10) or analog (cluster 69), and as analogs
 513 to diacylglycerol-trimethylhomoserine (DGTS, cluster 54) or 3-
 514 methylglutaconic acid (cluster 58).

515 Interestingly, but only in one individual (“R124M2”, replicate n°2 of
 516 Fmed LR124 mycelia grown with grapevine wood), 14 of them were mapped
 517 in cluster 12 to 15 and annotated as stilbene trimers (probably 4 isomers, m/z
 518 681.212, rt 7.0, 7.9, 8.1 and 8.4 min, ms 0.50 to 0.64, cluster 15), *epsilon*-
 519 viniferin (probably two isomers, m/z 455.149, rt 7.5 and 8.0 min, ms 0.90 and
 520 0.92, cluster 13), or *in silico* annotated as stilbene dimers (probably 3 isomers,
 521 chemically close to viniferin). In Tver mycelium grown on grapevine wood,

522 9 features were mapped in clusters 11 to 15 as well and annotated among
 523 others as *epsilon*-viniferin (two isomers), *s*-viniferin or as stilbene dimer (*in*
 524 *silico* annotated).

525 Common MS/MS features found in different relative abundancies in
 526 Fmed and Tver mycelia grown with grapevine wood were compared. All
 527 features more abundant in Fmed mycelium (21 features) were found in all
 528 other Fmed mycelia as well, and not in Tver control mycelium, suggesting
 529 that they are typical Fmed features, but not specific to the presence of
 530 grapevine wood. They were among others annotated as betaine (*m/z* 118.086,
 531 *ms* 0.99, cluster 29), 13-Keto-9Z,11E-octadecadienoic acid (*m/z* 295.227, *ms*
 532 0.74, cluster 60) or *allo*-protolichesterinic acid (*m/z* 325.274, *ms* 0.61, cluster
 533 76).

534 Conversely, some of the common features that were more abundant in
 535 Tver mycelium grown on grapevine wood than on Fmed mycelium grown
 536 on grapevine wood (121 features) were not found in Tver control mycelium
 537 (56 features), suggesting metabolomic changes in Tver mycelium due to the
 538 presence of wood. All those features were found in presence of all wood
 539 species except four of them, found only in presence of grapevine or oak
 540 wood. The latter were annotated as *epsilon*-viniferin (*m/z* 455.149, *ms* 0.91,
 541 cluster 13), or as analogs to hepta- and octapropylene glycol (= 1,2-
 542 propanediol polymers) (*m/z* 493.852, 551.894, 580.915, *ms* resp. 0.57, 0.64 and
 543 0.63, cluster 2).

544 Finally, MS/MS features found in different relative abundancies in
 545 Fmed mycelium grown with grapevine wood compared to Fmed mycelium
 546 grown with the two other wood species were compared. Among them, 12
 547 were more abundant in presence of grapevine wood compared to the two
 548 other wood species. They were annotated as *allo*-protolichesterinic acid (*m/z*
 549 325.274, *ms* 0.61, cluster 76) and *cis*-5,8,11-eicosatrienoic acid (*m/z* 307.263,
 550 *ms* 0.92, cluster 83), or as analogs to 9Z,11E,13E-Octadecatrienoic acid
 551 methyl ester (cluster 31), 9-Oxo-10E,12Z-octadecadienoic acid (cluster 41),
 552 sulfonolipid 11:0;O/22:5 (cluster 49) or 3-Keto-9Z,11E-octadecadienoic acid.
 553 Conversely, 12 were less abundant in presence of grapevine wood, and were
 554 annotated as hexosylceramides (HexCer, cluster 3), 1-(2-hydroxy-4,6-
 555 dimethoxyphenyl)-2-methoxyethan-1-one (cluster 86), 13S-Hydroxy-
 556 9Z,11E,15Z-octadecatrienoic acid (cluster 83), or as analogs to a steroid
 557 compound (see Figure S11, cluster 21), phytosphingosine (cluster 47), octa-
 558 or decapropylene glycol (cluster 55).

559 Thus, among the 3011 MS/MS features in all samples, a very few of them
 560 were specific to fungal-wood species interactions, in particular to Fmed and
 561 grapevine wood interaction. Six features were found in control grapevine
 562 wood and not after exposure to Fmed, suggesting a specific degradation by
 563 Fmed (sumaresinolic acid, analogs to KU036-11-7, to a polyketide and to
 564 neryl acetate), while others (125 features) were found after exposure to Fmed
 565 but not in control, in other wood species or after exposure to Tver
 566 (ceramides, glycerolipids, stilbenoids, phenolic compounds, other aromatic
 567 compounds, monoterpenoids and one alkenyl alcohol). However, a
 568 particularly high heterogeneity in wood samples metabolomic composition
 569 was observed. This was also true for mycelium samples, in which 227
 570 features were specific to Fmed mycelium grown with grapevine wood, but
 571 none of them were found in all replicates. Within Fmed mycelia, 24 features
 572 were highlighted as either more abundant in presence of grapevine wood
 573 (including *allo*-protolichesterinic acid, *cis*-5,8,11-eicosatrienoic acid (*m/z*
 574 307.263, *ms* 0.92, cluster 83), or analogs to fatty acids or sphingolipid), or less
 575 abundant (hexosylceramides, an acetophenone, a fatty acid, or analogs to a
 576 steroid compound, to phytosphingosine or to propylene glycols).

577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590

3.5. Thermal stability assay

Changes in metabolomic composition within wood blocks or mycelium were also evaluated using thermal stability assay (TSA). The GSTO2S isolated from Tver cultures, known for its interaction capacity with resveratrol and flavonoids [41], was used. Thermal shift (ΔT), *i.e.* the difference between GSTO2S denaturation temperature in presence of the extract compared to its control denaturation temperature, were obtained for each extract (Figure 9). St Martin wood extract was used as a positive control. An increase of the GSTO2S denaturation temperature (+ 4 to 11 degrees Celsius ($^{\circ}\text{C}$)) was observed in presence of Fmed LR124 mycelium grown on beech and on oak, and of all grapevine wood extracts. This increase reveals a stabilization of the GSTO2S in presence of the extracts. The stabilization was higher with extracts from grapevine wood exposed to fungal growth (+8 to 11°C) than with those from control grapevine wood ($+6^{\circ}\text{C}$).

591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604

4. Discussion

Physiological analyses highlighted Fmed traits that are common on the three woody substrates: the two Fmed strains show similar morphologies on the three wood species, both are able to degrade the three wood species, and a simultaneous degradation pattern is observed for all of them, consistently with previous observations [16,42]. Moreover, differences between Fmed and Tver are observed: Tver shows a simultaneous degradation pattern on grapevine and on oak wood, but a selective degradation pattern on beech wood. White-rot degradation pattern can be different upon fungal strains of one fungal species, or upon substrate differences, such as nitrogen content for example [40]. Further investigations are needed to know if a simultaneous degradation pattern is a typical Fmed trait, shared with more Fmed strains, and if substrate or environmental changes might influence this behavior.

605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617

Fmed and Tver also share similar traits: both fungal species were able to degrade grapevine, beech and oak wood blocks, with degradation rates ranging from 43 to 64% w/w dw. Noticeably, with all fungal strains, two groups were distinguished between oak wood blocks: one with low initial density (lower than 0.60) and with the highest mass loss among all wood species, and the other with higher initial densities (above 0.60), not degraded after exposure to any of the three fungal strains. This is consistent with previous studies, showing that wood density, depending on wood and fungal species, is involved in wood durability [39]. Moreover, a relatively large range of grapevine wood initial densities were observed (between 0.53 and 0.84), with no effect on degradation rate. Our results suggest thus that grapevine resistance to fungal decay by Fmed (or Tver) is not related to its density.

618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629

Physiological specificities between fungal and wood species are suggested. Fmed tends to produce more biomass on grapevine wood than on oak wood, and more than Tver on grapevine wood. Mass losses after exposure to Fmed tends to be higher for grapevine wood than for beech wood, and higher than for grapevine wood after exposure to Tver. Parallely, wood mass losses after exposure to Tver were higher for beech wood blocks than for grapevine. Our results suggest that Tver wood degradation capacity is higher on beech wood than on grapevine wood. Such observations could be due to wood chemical and anatomical traits [43]. However, intraspecific variability between the two Fmed strains is observed. Higher degradation rate for grapevine wood compared to beech wood is observed only for one Fmed strain (phco36). Thus, further investigations are needed to conclude

630 on specificities between Fmed and grapevine wood, or between Tver and
631 beech wood.

632 A high heterogeneity between wood samples degradation rates is also
633 observed, particularly for grapevine wood. Heterogeneity between
634 grapevine wood degradation rates might be due either to fungal individual
635 variability or to a high heterogeneity between grapevine wood blocks. This
636 would be consistent with the fact that grapevine is particularly exposed to
637 biotic and abiotic stresses, such as pruning or microbial colonization, which
638 could have led locally to physical and chemical changes even in close woody
639 tissues [44,45]. Wood mass loss also could have been biased due to fungal
640 biomass within wood blocks. It is possible that fungal individual variability
641 led to highly different amount of fungal biomass and thus to a higher
642 heterogeneity between wood samples degradation rates.

643 Wood samples showed different metabolomic compositions upon
644 wood species. This was particularly highlighted with *t*-SNE graphical
645 representation, where features only found in grapevine wood, degraded or
646 not (dark and light brown nodes), in beech wood (orange nodes) or in oak
647 wood (violet nodes) appeared in distinct clusters. Features typical to
648 grapevine wood were mapped in clusters 11 to 15, and 71. Annotated
649 features correspond to stilbenes oligomers (clusters 11 to 15), or to
650 resveratrol (cluster 71). According to their close MS/MS spectra, all features
651 in clusters 11 to 15 are probably stilbene oligomers, including dimers, trimers
652 and tetramers (*m/z* 908.279). Those observations are consistent with the well-
653 known abundancy of stilbenes in grapevine wood [46,47]. Stilbenes were
654 found in control as well as in wood exposed to fungal degradation,
655 suggesting no or low fungitoxicity. Still, in wood exposed to fungal
656 degradation, with all strains, less resveratrol than in grapevine control
657 wood, and two features not found in control grapevine wood, mapped in
658 cluster 15, with *m/z* 907.275, 908.279 and 908.296 respectively, are found.
659 According to the close MS/MS fragmentation pattern with other stilbene
660 oligomers, shown by *t*-SNE algorithm, the three latter features might be
661 stilbene tetramers. Those results suggest both resveratrol degradation and
662 stilbene oligomerization. Stilbene oxidation, followed by oligomerization,
663 can occur either spontaneously or under fungal activity [18,48–50]. Chemical
664 mechanisms of stilbenes oligomerization were shown to involve peroxidases
665 [19,51,52] and laccases [53], produced for example by *Trametes pubescens*. The
666 latter can catalyze hydroxystilbenes oxidation and dimerization [18]. Fmed
667 and Tver are able to produce and secrete both peroxidases and laccases [6],
668 which could be involved in stilbenes oxidation and oligomerization. Such
669 mechanisms could play a role either in detoxication processes or as a supply
670 in additional carbon source [54,55]. Further specific investigations are
671 needed to better understand the role of such mechanisms during wood
672 degradation.

673 Potential biological activities of the samples were investigated through
674 their interactions with a fungal GST (Tver GSTO2S). TSA is a tool to compare
675 the potential of interactions between wood or mycelium extracts and a
676 fungal Glutathione Transferase (GST). Interactions between extractives and
677 GSTs can be used as indicators of extractives biological properties [39,56].
678 Grapevine wood samples after exposure to fungal degradation (with the
679 three strains) interact more with the GST than control grapevine wood,
680 which probably reflects metabolomic changes, affecting biological
681 properties of the wood extracts. Those changes can be related to the changes
682 observed in stilbenoids composition in grapevine wood samples. Indeed,
683 stilbenes oligomers, more abundant after exposure to fungal degradation,
684 are known to exhibit higher fungitoxicity than their respective monomers

685 [57]. As white-rot fungi can oxidize and oligomerize stilbenoids,
686 oligomerization might be a step in the detoxification process involving GSTs
687 [15]. Oligomerization also affect stilbenoids chemical properties, such as
688 their solubility, which could be involved in their biological properties
689 [46,58,59]. Such metabolomic changes due to fungal exposure might
690 contribute to grapevine wood colonization by both Fmed and Tver.

691 Parallely, in grapevine wood, metabolomic specificities after exposure
692 to Fmed are observed. Few features, annotated as sumaresinolic acid, or as
693 analogs to KU036-11-7, to a polyketide or to neryl acetate are found in
694 grapevine control wood and after exposure to Tver, but not after exposure
695 to Fmed. Thus, they could have been degraded only by Fmed. Sumaresinolic
696 acid is a triterpenoid that can be found in wood, such as in the trunk of *Coffea*
697 *canephora* [60]. However, terpenoids were not reported in grapevine wood
698 metabolomic studies, maybe due to the high prevalence of phenolic
699 compounds, including stilbenes and flavonoids [10,11,61]. Compound KU-
700 036-11-7 is a triterpenoid with two aromatic rings identified in *Eremophila*
701 *rugosa* leaves [62]. MS/MS data suggest that the feature found in our samples,
702 with *m/z* 491.373 and annotated as analog to KU036-11-7, share chemical
703 structural parts with KU036-11-7. It is also closely related to the other
704 features found in clusters 7 and 8, which include namely one glycosylated
705 phenolic ester (Figure S12). Glycosylation of phenolic compounds plays
706 several essential roles in plants and can namely increase fungal growth
707 inhibition activities [63]. It is likely that Fmed was able to degrade the
708 hereabove mentioned features, at least more efficiently than Tver, but due to
709 a high heterogeneity between samples, further investigations are needed.

710 MS/MS features found only in grapevine wood after exposure to Fmed
711 (and not in any other wood samples, 121 features) also suggest Fmed
712 specificities on grapevine wood. They might be wood degradation products
713 or fungal metabolites, and are annotated as ceramides, monoglycerolipids,
714 stilbenoids, phenolic compounds, other aromatic compounds,
715 monoterpenoids or alkenyl alcohols. Ceramides and glycerolipids are
716 members of the sphingolipids, found in both plants and fungi [64]. Their
717 structural specificities can help to decipher their fungal or plant origin [65].
718 Ceramides found in our samples contain the sphingoid base 4-
719 hydroxysphinganine, or phytosphingosine. The latter is found both in plants
720 and fungi and is the sphingoid base of glycosyl inositol phosphoryl
721 ceramides, which are typical membrane lipids. Thus, they can result from
722 both wood or fungal membrane degradation, due respectively to wood
723 degradation or to fungal autolyse.

724 Glycerolipids can be found in fungi mostly as triglycerides, and often
725 play a role as storage compounds [66]. However, living tissues extraction
726 procedure might release lipases, often still active in organic solvents, which
727 could degrade fungal or wood lipids, and artificially produce smaller lipids
728 such as monoglycerids or fatty acids [67]. To further investigate Fmed
729 specific lipids, extraction procedure could be improved specifically for
730 lipids, namely through solvent acidification. Here should be noticed that
731 lipids might be overestimated compared to carbohydrates as they are better
732 ionized in MS [68]. Extraction procedure could be improved also to
733 investigate more specifically wood extractives or fungal metabolites
734 belonging to different chemical families. Moreover, heterogeneity between
735 wood samples metabolomic composition was particularly high, and thus it
736 is difficult to conclude on fungal-substrate specificities.

737 In mycelium samples, 227 features are found only in Fmed mycelia
738 grown with grapevine wood. However, a high heterogeneity between
739 samples is observed. Among them, 20 are found in at least two replicates,

740 and are annotated as *allo*-protolichesterinic acid, or as analogs to a
 741 nitrogenous aromatic compound (cluster 30), to DGTS (cluster 54) or to a
 742 dicarboxylic acid (cluster 58). Few other features only found in Fmed
 743 mycelium and more abundant when grown on grapevine wood (12 features)
 744 were annotated as *allo*-protolichesterinic acid, *cis*-5,8,11-eicosatrienoic acid
 745 (cluster 83), and analogs to fatty acids or to sphingolipids. Finally, 21 features
 746 are found in both Fmed and Tver mycelium and more abundant in Fmed
 747 than in Tver mycelium grown on grapevine wood and were annotated as
 748 betaine, 13-Keto-9Z,11E-octadecadienoic acid or *allo*-protolichesterinic acid.
 749 The latter is a *gamma*-lactone commonly found in lichens with antimicrobial
 750 activities [69,70]. No previous study reporting its production by fungi was
 751 found, and further experiments are needed to validate its annotation.
 752 Features annotated as fatty acids or analogs are stearic acid (C18)
 753 derivatives, which is consistent with typical fungal sphingolipids structure
 754 [64]. They might be present as free fatty acids in Fmed mycelium, or as a
 755 result of enzymatic lipids degradation during extraction [66,67]. Their role
 756 in Fmed adaptation remains unclear, and further investigations are needed.
 757 Moreover, as previously mentioned, improved extraction procedure,
 758 namely, to better distinguish lipids from more polar compounds, could
 759 highlight more metabolomic specificities.

760 5. Conclusions

761 Fungal-substrate specificities were studied through physiological and
 762 metabolomic traits during grapevine, beech or oak wood blocks colonization
 763 by two Fmed strains and the white-rot model Tver. Fmed was able to
 764 degrade the three wood species and showed a simultaneous degradation
 765 pattern on all of them. Regarding wood mass loss and fungal biomass after
 766 7 months of culture, a noticeable intraspecific variability was observed
 767 between the two Fmed strains, and a high heterogeneity between samples,
 768 especially between grapevine wood samples. A higher mass loss was
 769 observed for grapevine wood blocks compared to beech wood blocks only
 770 for one Fmed strain, and the contrary was observed after exposure to Tver.
 771 Further investigations are needed, namely with other Fmed and Tver strains,
 772 to confirm eventual Fmed substrate preferences. Moreover, the highest
 773 degradation rate was observed for oak wood with all fungal strains. For this
 774 species only, initial wood density was the most critical factor explaining
 775 wood degradation rate, and only low-density oak wood blocks were
 776 degraded.

777 Non-targeted metabolomic analyses on wood blocks and mycelia
 778 highlighted fungal and wood species specificities, but also a high
 779 heterogeneity between samples. Molecular networking was successfully
 780 used to describe samples metabolomic composition. Changes in grapevine
 781 wood composition after exposure to the three fungal strains were observed,
 782 such as a diminution of resveratrol and an increase of stilbenes oligomers.
 783 After fungal degradation, grapevine wood extracts also interacted more than
 784 non-degraded grapevine wood extracts with the fungal GSTO2S, which
 785 suggests differences in the extracts' biological activities. Specificities
 786 between Fmed and grapevine wood were discussed regarding both wood
 787 and mycelium metabolites.

788 This study investigated the role of wood composition as Fmed substrate
 789 and described physiological and metabolomic changes due to fungal
 790 exposure. However, other factors play a key role in fungal wood
 791 colonization and are probably involved in Fmed adaptation in vineyard. For
 792 example, in response to stress such as pathogen attack, more and maybe
 793 different extractives would be found in wood, and Fmed might be

794 specifically adapted to grapevine stress responses. Grapevine wood
795 physiological state, as well as environmental conditions might also play a
796 role in Fmed traits. Thus, the proposed physiological and non-targeted
797 metabolomic approach with molecular networking should be further
798 investigated and improved in order to better understand Fmed widespread
799 in vineyard.
800

Figures



Figure 1. morphological observation of culture flasks after 4 and 7 months of Fmed phco36, Fmed LR124 and Tver BRFM1532 cultures on malt-agar (control) or on malt-agar with wood blocks (3 blocks per flask) of oak, beech or grapevine wood.

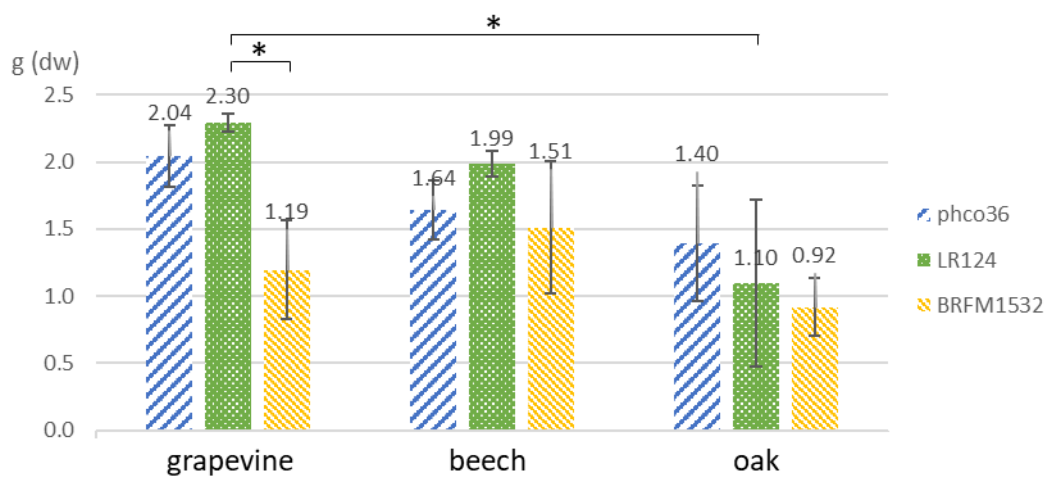


Figure 2. Mycelium dry weight per flask collected after 7-months of culture. Kruskal-Wallis with Nemenyi paired-test (*: p-value<0.05).

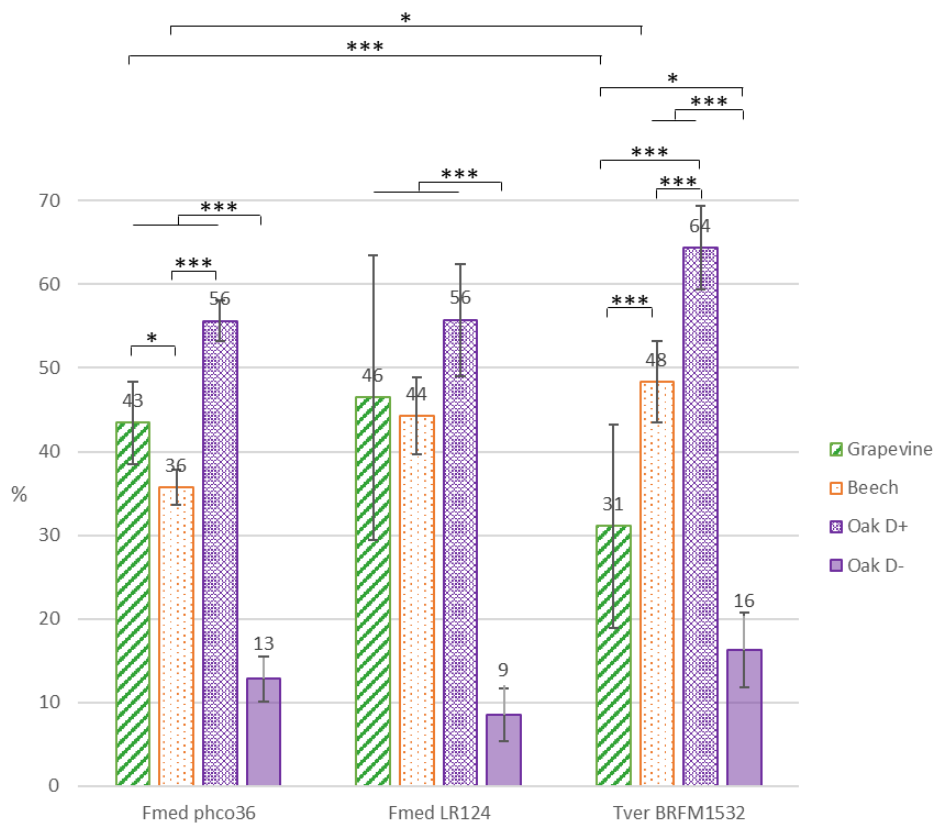


Figure 3. Wood blocks mass loss in percentage of their initial dry weight. Error bars are standard error of the mean (n=10 except for oak wood exposed to Fmed : n=5 and to BRFM1532 : n=4 and 6 resp. for oak D+ and oak D-). Oak wood mass losses were distinguished into two groups: D+ = showing a higher mass loss, and D- = showing a lower mass loss. Statistic test: Student-Newman-Keuls (***: p-value<0.001; **: p-value<0.005; *: p-value<0.05).

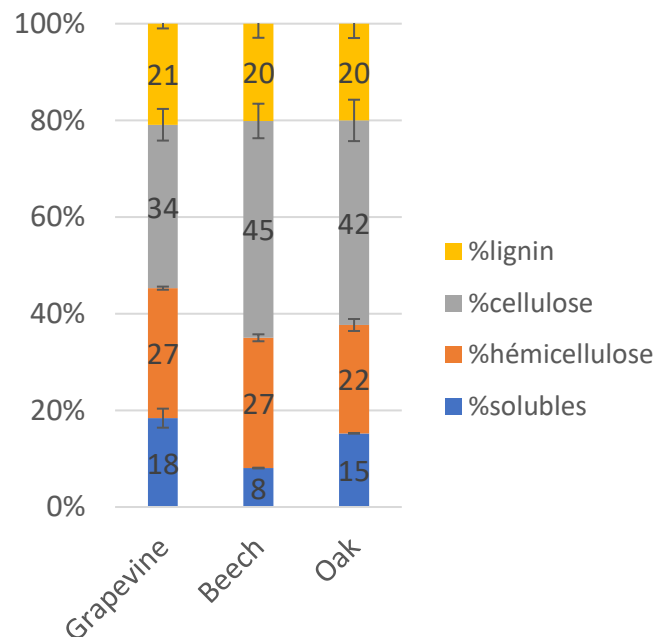


Figure 4. Wood initial proportions in lignin, cellulose, hemicelluloses and soluble compounds for grapevine, beech and oak wood blocks. Error bars give the standard error of the mean between two technical replicates.

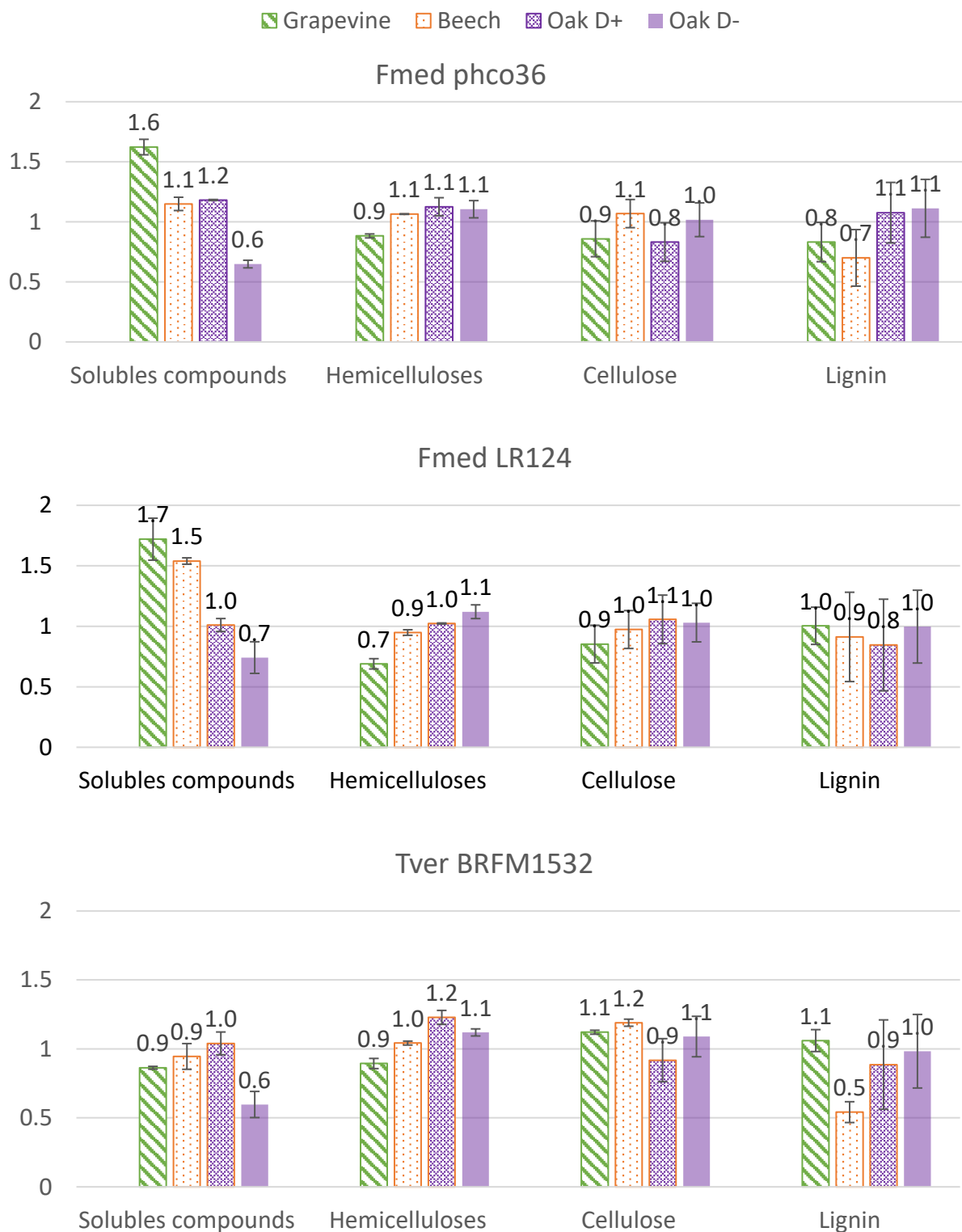


Figure 5. Final/initial contents ratios for each wood compound (solubles, hemicelluloses, cellulose and lignin) after 7months of culture in grapevine, beech and oak wood blocks with Fmed phco36, LR124 and Tver BRFM1532. Error bars include standard error of the mean between the two technical replicates after 7months of culture and for initial composition. Oak wood blocks were separated according to the two groups observed regarding their mass loss (Figure 3) : “Oak D+” = higher mass loss ; “Oak D-” = lower mass loss

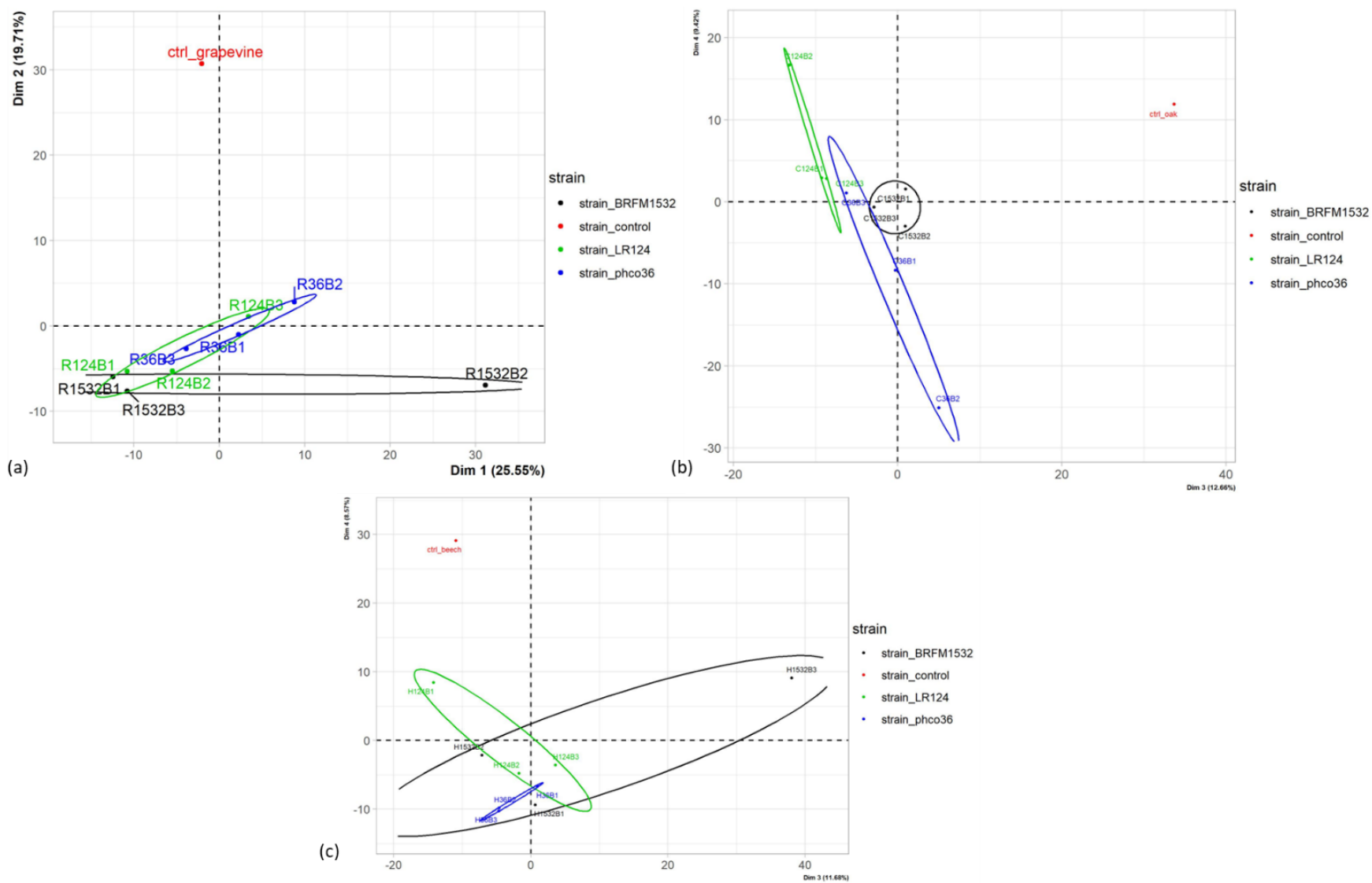


Figure 6. PCA analysis (a) on grapevine wood samples (dimensions 1 and 2), or on (b) oak and (c) beech wood samples (dimensions 3 and 4), after exposure to each fungal strain or control woods. For sample names see Supplementary Material Figure S2 caption.

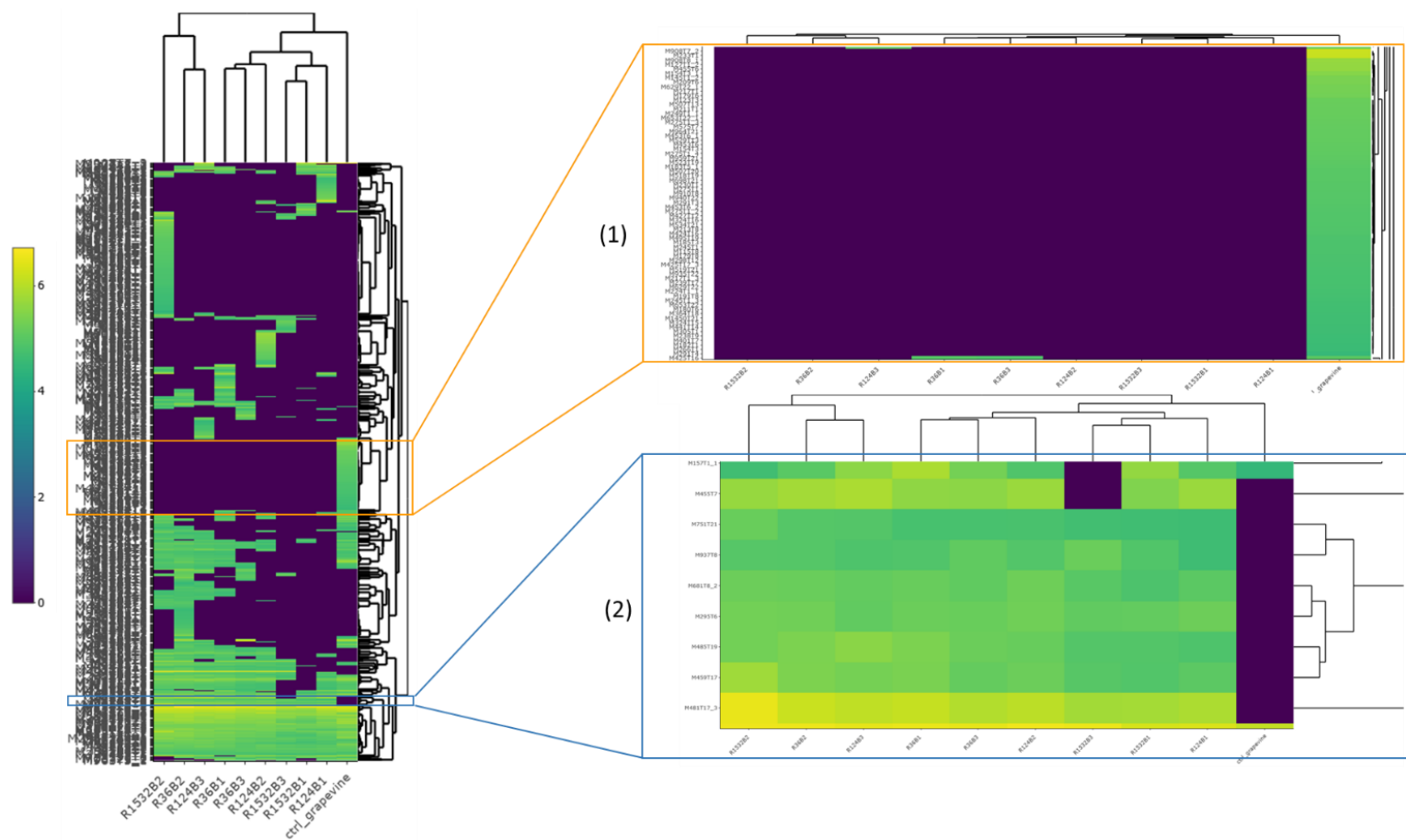


Figure 7. Log₁₀ relative abundances of MS features found in grapevine wood samples (588 features): among them, 69 were found only in control wood sample (close-up 1), and 7 were found only after exposure to all fungal strains (close-up 2). (For sample names see Supplementary Material Figure S2 caption.). Features names are given according to their *m/z* (“M”) and retention time (“T”) in min.

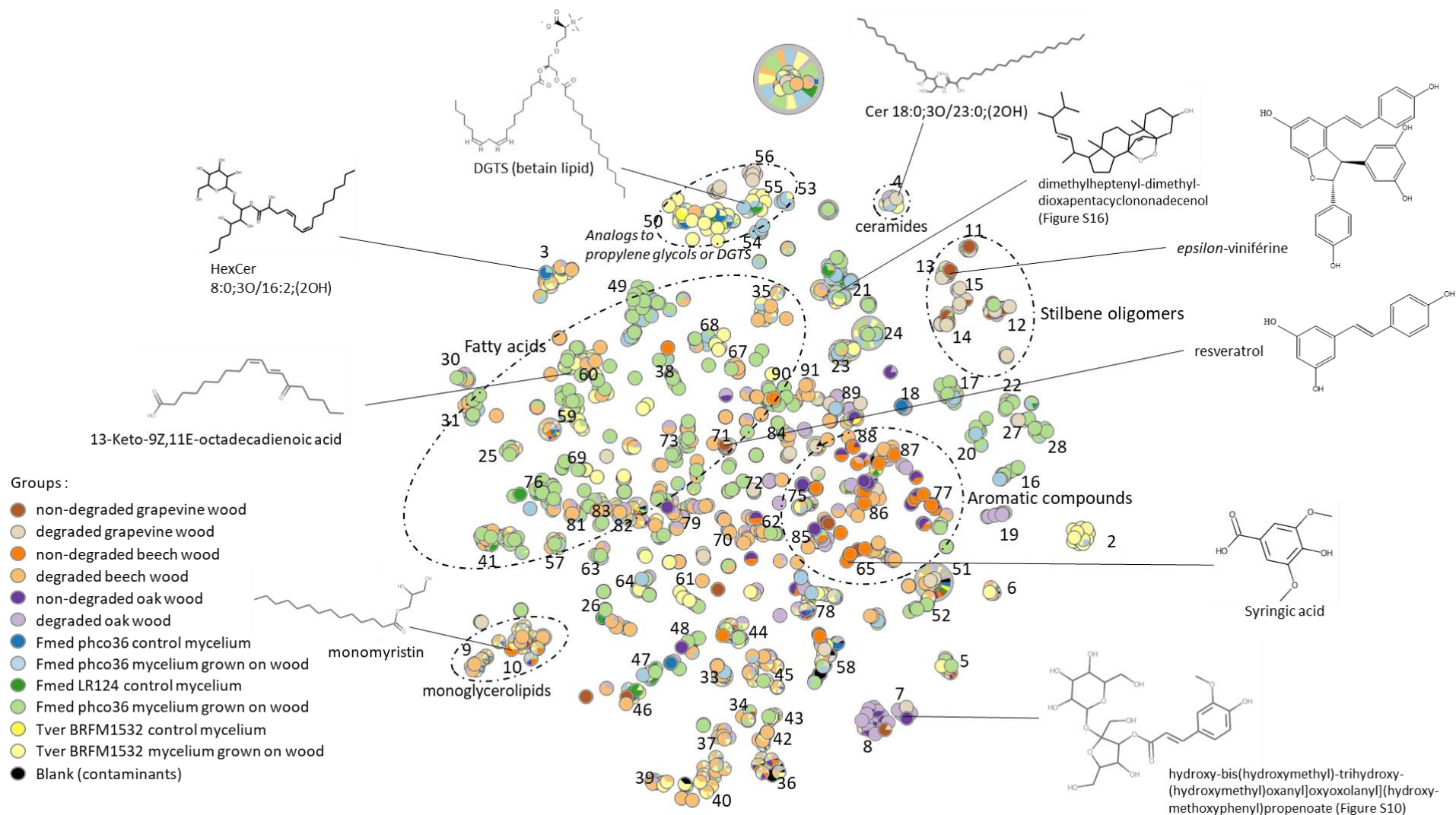


Figure 8. *t*-SNE graphical representation of the 3011 selected MS/MS features from all samples (wood and mycelium extracts). Minimal cosine score was set at 0.75. The numbers are corresponding to clusters constructed with MetGem. Circles were constructed manually according to GNPS and MS-DIAL databases annotation results. Nodes colors are corresponding to the relative proportions of each feature in the sample groups : non-degraded grapevine, beech and oak wood are respectively corresponding to control grapevine, beech and oak wood extracts; degraded grapevine, beech and oak wood are corresponding to extracts of woods after exposure to all three strains; for each strain, mycelium grown on wood group correspond to all mycelia grown on the three wood species. Nodes in black or with black are features also found in blank sample (methanol alone) and correspond to contaminants.

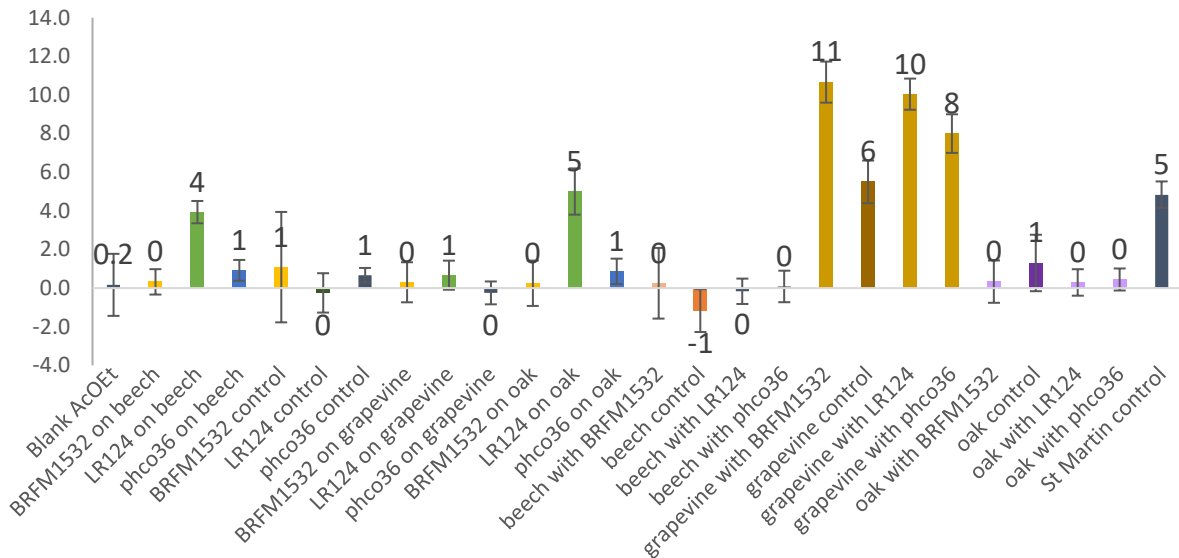
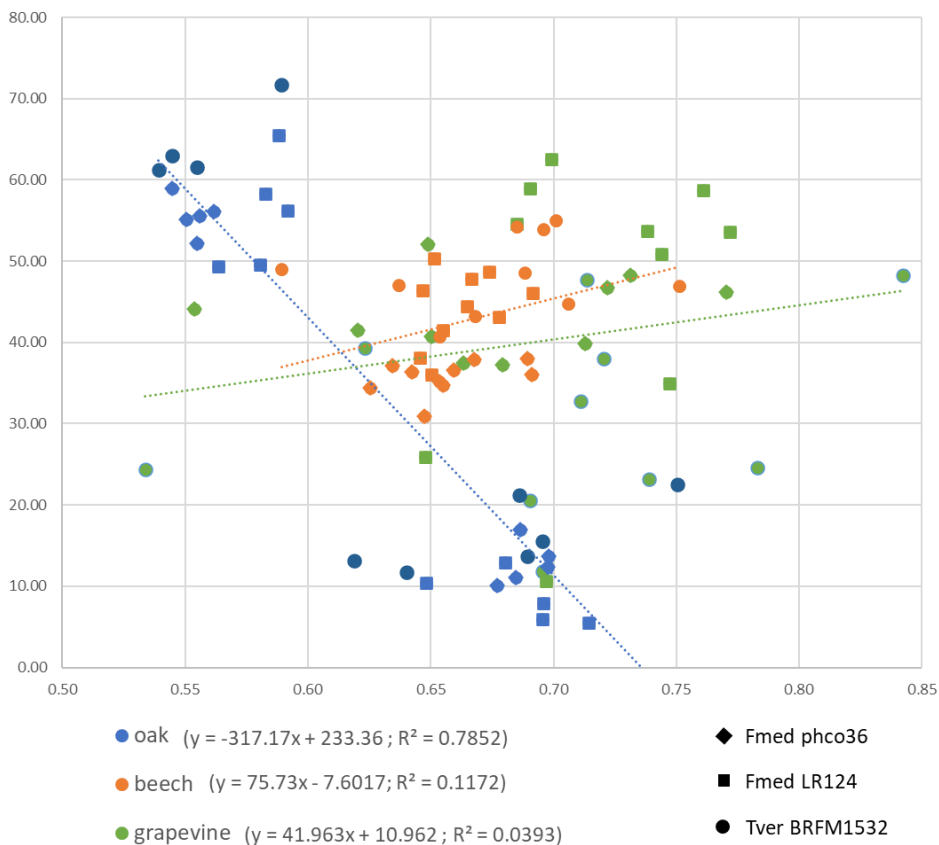
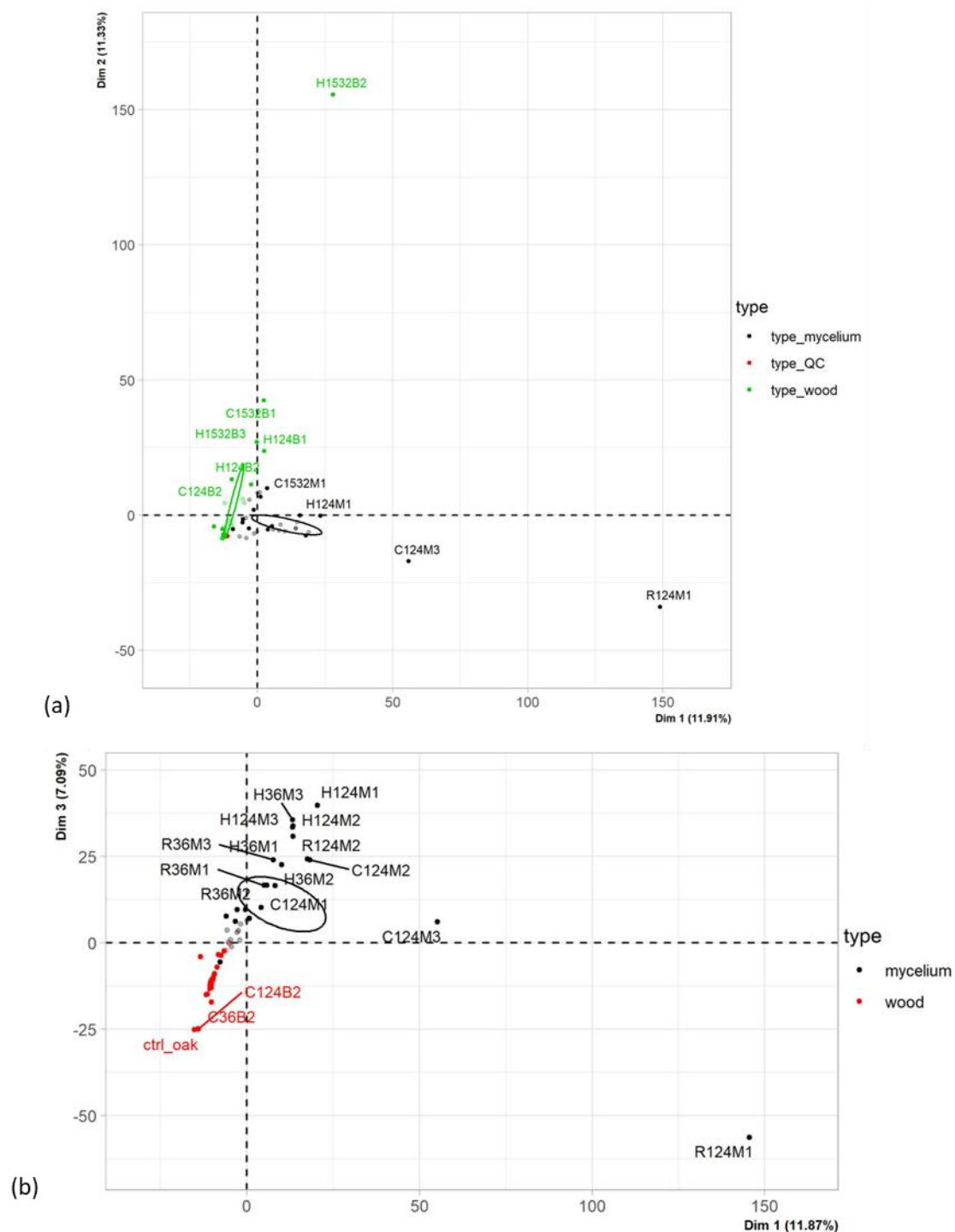


Figure 9. GSTO2S denaturation temperature shift (ΔT) in presence of blank extract (Blank AcOEt), mycelium extracts (BRFM1532 on beech to phco36 on oak) or wood extracts (from beech with BRFM1532 to St Martin control) relative to control denaturation temperature (in presence of DMSO only).



Supplementary Material Figure S1. Wood blocks mass losses for each wood species after exposure to fungal degradation by the three strains Fmed phco36, Fmed LR124 and Tver BRFM1532, as a function of their initial density calculated on dry weight. Trend line equations and correlation coefficient (R^2) are given for each wood species exposed to all fungal strains taken together.



Supplementary Material Figure S2 PCA analysis on all samples (a) with Quality Control (QC) samples on dimensions 1 and 2, (b) without QC on dimensions 1 and 3. Colors are given according to sample type (green (a) or red (b) = mycelia extracts from Fmed phco36 mycelia grown on grapevine (“R36MX”), beech (“H36MX”) or oak (“C36MX”) wood); or red from Fmed LR124 mycelia grown on the three woods (resp. “R124MX”, “H124MX” and “C124MX”), from Tver BRFM1532 mycelia grown on the three woods (resp. “R1532MX”, “H1532MX” and “C1532MX”), or from Fmed phco36 (“ctrl36”), LR124 (“ctrl124”) or Tver BRFM1532 (“ctrl1532”) mycelia grown on malt-agar media without wood; red (a) = Quality Control (“QCMDSX”); black (a and b) = wood extracts from grapevine wood exposed to Fmed phco36 (“R36BX”), Fmed LR124 (“R124BX”) or Tver BRFM1532 (“R1532BX”), from beech wood exposed to the three strains (resp. “H36BX”, “H124BX”, “H1532BX”), from oak wood exposed to the three strains (resp. “C36BX”, “C124BX”, “C1532BX”), or from grapevine, beech or oak control woods (resp. “ctrl_grapevine”, “ctrl_beech” and “ctrl_oak”). For all sample names “X” refers to each biological repetition for wood and mycelia extracts, and to technical replicate for quality controls and blanks.

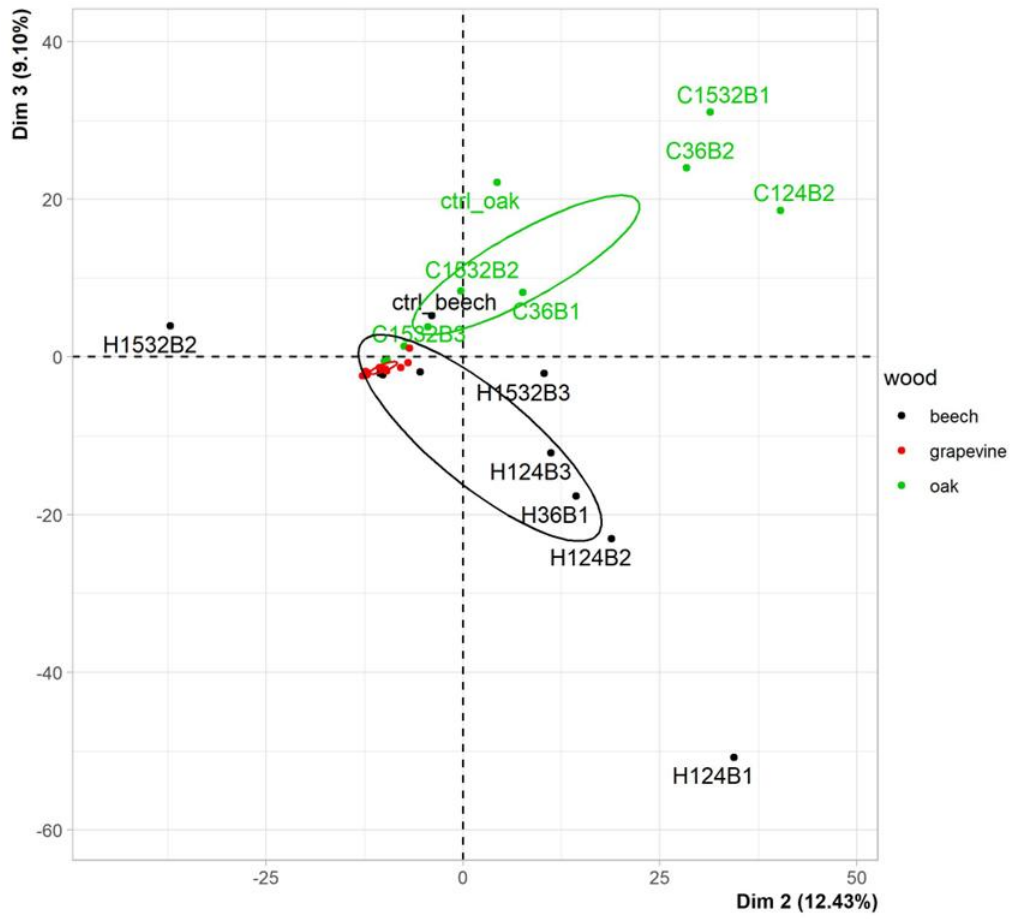


Figure S3. Dimensions 2 and 3 of PCA analysis on wood extracts. For sample names see Supplementary Material Figure S2 caption.

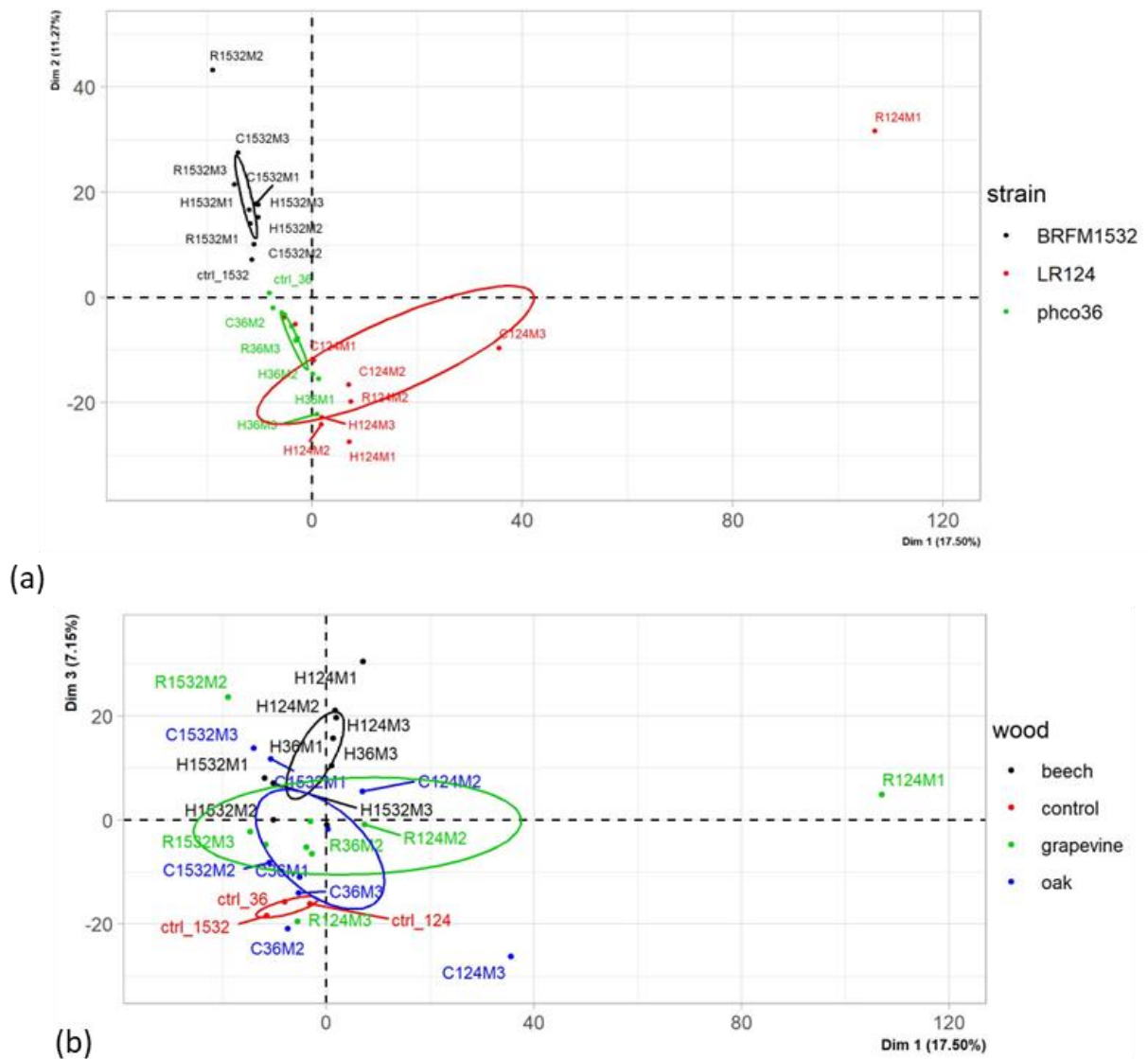


Figure S4. PCA analysis on mycelium extracts on dimensions (a) 1, 2 and (b) 1 and 3. For sample names see Supplementary Material Figure S2 caption.

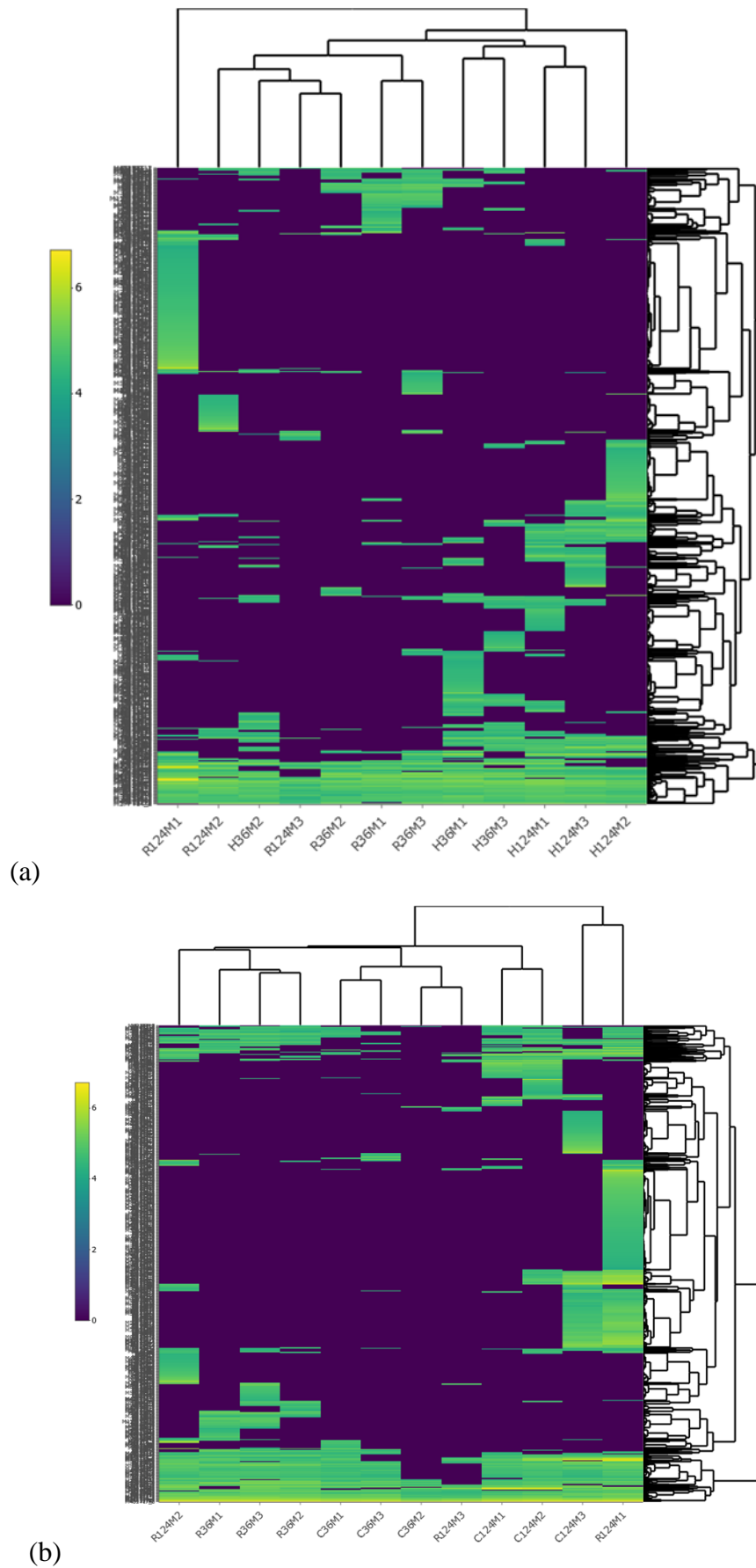


Figure S5. Log10 relative abundances of MS features significantly different between Fmed mycelia grown with (a) grapevine or beech wood (851 features) and with (b) grapevine or oak wood (796 features). (For sample names see Supplementary Material Figure S2 caption.).

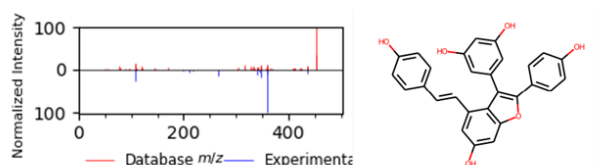


Figure S6. MS/MS spectra of feature m/z 453.133 (compound 1) compared to spectra from ISDB (*in-silico*) database (m/z 453.133), and *in-silico* proposed structure (ISDB - ©GNPS). Match score was 0.52.

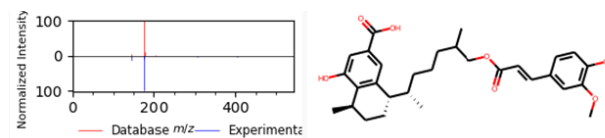


Figure S7. MS/MS spectra of feature m/z 491.373 (Experimental) compared to KU036-11-7 M+H (m/z 511.268) spectra from GNPS-LIBRARY database, and structure of the standard (©GNPS). Match score as analogs was 0.82.

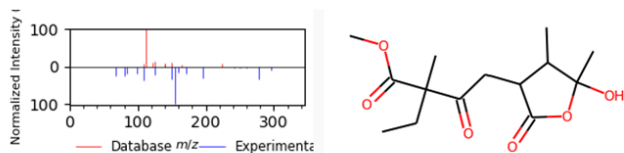


Figure S8. MS/MS spectra of feature m/z 348.275 (Experimental) compared to methyl 2-ethyl-4-[(3R,4R,5S)-5-hydroxy-4,5-dimethyl-2-oxoxolan-3-yl]-2-methyl-3-oxobutanoate (m/z 304.176) spectra from database, and structure of the standard (©GNPS). Match score as analogs was 0.59.

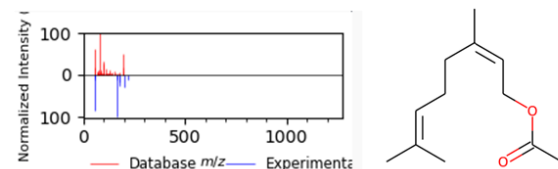


Figure S9. MS/MS spectra of feature m/z 277.180 (Experimental) compared to nerylacetate (m/z 197.154) spectra from database, and structure of the standard (©GNPS). Match score as analogs was 0.80.

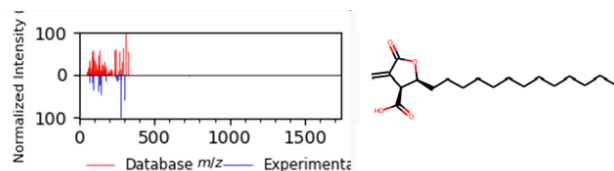


Figure S10. MS/MS spectra of feature m/z 330.264 (cluster 69) compared to spectra from allo-protolichesterinic acid [M+NH₄] database (m/z 342.364), and allo-protolichesterinic acid structure (ISDB - ©GNPS). Match score as analogs was 0.68.

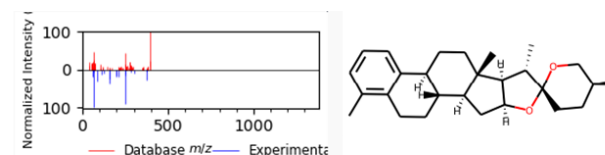


Figure S11. MS/MS spectra of feature m/z 407.331 (cluster 21) compared to spectra from the *in silico* proposed standard UNPD133062 (ISDB database, m/z 395.294), and the *in silico* structure (©GNPS). Match score as analogs was 0.53.

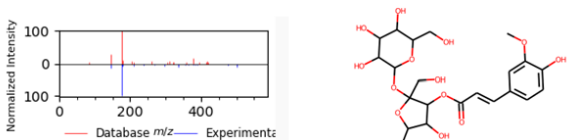


Figure S12. MS/MS spectra of feature m/z 519.201 (Experimental) compared to [(2S,3S,4R,5R)-4-hydroxy-2,5-bis(hydroxymethyl)-2-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyoxolan-3-yl] (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoate (m/z 519.171) spectra from database, and structure of the standard (©GNPS). Match score was 0.56.

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**, *54*, 51–67, doi:10.1007/s13225-012-0171-z.
2. Bertsch, C.; Ramírez-Suero, M.; Magnin-Robert, M.; Larignon, P.; Chong, J.; Abou-Mansour, E.; Spagnolo, A.; Clément, C.; Fontaine, F. Grapevine Trunk Diseases: Complex and Still Poorly Understood: *Grapevine Trunk Diseases. Plant Pathology* **2013**, *62*, 243–265, doi:10.1111/j.1365-3059.2012.02674.x.
3. Fischer, M. Biodiversity and Geographic Distribution of Basidiomycetes Causing Esca-Associated White Rot in Grapevine: A Worldwide Perspective. *Phytopathol. Mediterr.* **2006**, *45*, 13.
4. Fischer, M.; Garcia, V.G. An Annotated Checklist of European Basidiomycetes Related to White Rot of Grapevine (*Vitis Vinifera*). *Phytopathol. Mediterr.* **2015**, *54*, 281–298.
5. Moretti, S.; Pacetti, A.; Pierron, R.; Kassemeyer, H.-H.; Fischer, M.; Péros, J.-P.; Perez-Gonzalez, G.; Bieler, E.; Schilling, M.; Di Marco, S.; et al. *Fomitiporia Mediterranea* M. Fisch., the Historical Esca Agent: A Comprehensive Review on the Main Grapevine Wood Rot Agent in Europe. *Phytopathol. Mediterr.* **2021**, *60*, 351–379, doi:10.36253/phyto-13021.
6. Floudas, D.; Binder, M.; Riley, R.; Barry, K.; Blanchette, R.A.; Henrissat, B.; Martínez, A.T.; Otiillar, R.; Spatafora, J.W.; Yadav, J.S.; et al. The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Decomposition Reconstructed from 31 Fungal Genomes. *Science* **2012**, *336*, 1715–1719, doi:10.1126/science.1221748.
7. Del Frari, G.; Oliveira, H.; Boavida Ferreira, R. White Rot Fungi (Hymenochaetales) and Esca of Grapevine: Insights from Recent Microbiome Studies. *JoF* **2021**, *7*, 770, doi:10.3390/jof7090770.
8. Girometta, C.E.; Bernicchia, A.; Baiguera, R.M.; Bracco, F.; Buratti, S.; Cartabia, M.; Picco, A.M.; Savino, E. An Italian Research Culture Collection of Wood Decay Fungi. *Diversity* **2020**, *12*, 58, doi:10.3390/d12020058.
9. Schilling, M.; Farine, S.; Péros, J.-P.; Bertsch, C.; Gelhaye, E. Wood Degradation in Grapevine Diseases. In *Wood Degradation and Ligninolytic Fungi*; Advances in Botanical Research (ABR); 2021; Vol. 99, p. Chapter 6.
10. Labois, C.; Wilhelm, K.; Laloue, H.; Tarnus, C.; Bertsch, C.; Goddard, M.-L.; Chong, J. Wood Metabolomic Responses of Wild and Cultivated Grapevine to Infection with *Neofusicoccum Parvum*, a Trunk Disease Pathogen. *Metabolites* **2020**, *10*, 232, doi:10.3390/metabo10060232.
11. Magnin-Robert, M.; Spagnolo, A.; Boulanger, A.; Joyeux, C.; Clément, C.; Abou-Mansour, E.; Fontaine, F. 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, doi:10.1094/PHYTO-09-15-0207-R.
12. Morel-Rouhier, M. Wood as a Hostile Habitat for Ligninolytic Fungi. In *Wood degradation and ligninolytic fungi*; Elsevier, 2021; Vol. 99, pp. 115–149 ISBN 978-0-12-821686-6.
13. Valette, N.; Perrot, T.; Sormani, R.; Gelhaye, E.; Morel-Rouhier, M. Antifungal Activities of Wood Extractives. *Fungal Biology Reviews* **2017**, *31*, 113–123, doi:10.1016/j.fbr.2017.01.002.
14. Hart, J.H.; Hillis, W.E. Inhibition of Wood-Rotting Fungi by Ellagitannins in the Heartwood of *Quercus Alba*. *Phytopathology* **1972**, *62*, 620–626, doi:10.1094/Phyto-62-620.
15. Morel, M.; Meux, E.; Mathieu, Y.; Thuillier, A.; Chibani, K.; Harvengt, L.; Jacquot, J.-P.; Gelhaye, E. Xenomic Networks Variability and Adaptation Traits in Wood Decaying

- Fungi: Fungal Xenomic Networks. *Microbial Biotechnology* **2013**, *6*, 248–263, doi:10.1111/1751-7915.12015.
16. Schilling, M.; Maia-Grondard, A.; Baltenweck, R.; Robert, E.; Huguene, P.; Bertsch, C.; Farine, S.; Gelhaye, E. Wood Degradation by *Fomitiporia Mediterranea* M. Fischer: Physiologic, Metabolomic and Proteomic Approaches. *Frontiers in Plant Science* **2022**, *13*, 988709, doi:10.3389/fpls.2022.988709.
 17. Abou-Mansour, E.; Polier, J.; Pezet, R.; Tabacchi, R. Purification and Partial Characterisation of a 60 KDa Laccase From. *Phytopathologia Mediterranea* **2009**, *48*, 8.
 18. Ponzoni, C.; Beneventi, E.; Cramarossa, M.R.; Raimondi, S.; Trevisi, G.; Pagnoni, U.M.; Riva, S.; Forti, L. Laccase-Catalyzed Dimerization of Hydroxystilbenes. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1497–1506, doi:10.1002/adsc.200700043.
 19. Wilkens, A.; Paulsen, J.; Wray, V.; Winterhalter, P. Structures of Two Novel Trimeric Stilbenes Obtained by Horseradish Peroxidase Catalyzed Biotransformation of *Trans* - Resveratrol and (–)- ϵ -Viniferin. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6754–6761, doi:10.1021/jf100606p.
 20. Wang, H.; Sun, K.; Guan, Y.; Qiu, M.; Zhang, L.; Dai, C. Fungal Endophyte *Phomopsis Liquidambari* Biodegrades Soil Resveratrol: A Potential Allelochemical in Peanut Monocropping Systems. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 5899–5909, doi:10.1002/jsfa.9865.
 21. Bills, G.F.; Gloer, J.B.; Heitman, J.; Howlett, B.J.; Stukenbrock, E.H. Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. *Microbiology Spectrum* **2016**, *4*, 4.6.01, doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0009-2016.
 22. Idnurm, A.; Bahn, Y.-S.; Nielsen, K.; Lin, X.; Fraser, J.A.; Heitman, J. Deciphering the Model Pathogenic Fungus *Cryptococcus Neoformans*. *Nat Rev Microbiol* **2005**, *3*, 753–764, doi:10.1038/nrmicro1245.
 23. Scharf, D.H.; Heinekamp, T.; Brakhage, A.A. Human and Plant Fungal Pathogens: The Role of Secondary Metabolites. *PLoS Pathog* **2014**, *10*, e1003859, doi:10.1371/journal.ppat.1003859.
 24. Overy, D.P.; Smedsgaard, J.; Frisvad, J.C.; Phipps, R.K.; Thrane, U. Host-Derived Media Used as a Predictor for Low Abundant, in Planta Metabolite Production from Necrotrophic Fungi. *J Appl Microbiol* **2006**, *101*, 1292–1300, doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03037.x.
 25. Tabacchi, R.; Fkyerat, A.; Poliart, C.; Dubin, G.-M. Phytotoxins from Fungi of Esca of Grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* **2000**, *39*, 6.
 26. Hebra, T.; Elie, N.; Poyer, S.; Van Elslande, E.; Touboul, D.; Eparvier, V. Dereplication, Annotation, and Characterization of 74 Potential Antimicrobial Metabolites from *Penicillium Sclerotiorum* Using t-SNE Molecular Networks. *Metabolites* **2021**, *11*, 444, doi:10.3390/metabo11070444.
 27. Olivon, F.; Retailleau, P.; Desrat, S.; Touboul, D.; Roussi, F.; Apel, C.; Litaudon, M. Isolation of Picrotoxanes from *Austrobuxus Carunculatus* Using Taxonomy-Based Molecular Networking. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 3069–3079, doi:10.1021/acs.jnatprod.0c00636.
 28. Watrous, J.; Roach, P.; Alexandrov, T.; Heath, B.S.; Yang, J.Y.; Kersten, R.D.; van der Voort, M.; Pogliano, K.; Gross, H.; Raaijmakers, J.M.; et al. Mass Spectral Molecular Networking of Living Microbial Colonies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, doi:10.1073/pnas.1203689109.
 29. Shannon, P.; Markiel, A.; Ozier, O.; Baliga, N.S.; Wang, J.T.; Ramage, D.; Amin, N.; Schwikowski, B.; Ideker, T. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* **2003**, *13*, 2498–2504, doi:10.1101/gr.1239303.
 30. Aron, A.T.; Gentry, E.C.; McPhail, K.L.; Nothias, L.-F.; Nothias-Esposito, M.; Bouslimani, A.; Petras, D.; Gauglitz, J.M.; Sikora, N.; Vargas, F.; et al. Reproducible

- Molecular Networking of Untargeted Mass Spectrometry Data Using GNPS. *Nat Protoc* **2020**, *15*, 1954–1991, doi:10.1038/s41596-020-0317-5.
31. Frank, A.M.; Monroe, M.E.; Shah, A.R.; Carver, J.J.; Bandeira, N.; Moore, R.J.; Anderson, G.A.; Smith, R.D.; Pevzner, P.A. Spectral Archives: Extending Spectral Libraries to Analyze Both Identified and Unidentified Spectra. *Nat Methods* **2011**, *8*, 587–591, doi:10.1038/nmeth.1609.
 32. Wang, M.; Carver, J.J.; Phelan, V.V.; Sanchez, L.M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D.D.; Watrous, J.; Kaponov, C.A.; Luzzatto-Knaan, T.; et al. Sharing and Community Curation of Mass Spectrometry Data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol* **2016**, *34*, 828–837, doi:10.1038/nbt.3597.
 33. , *90*, 13900–13908, doi:10.1021/acs.analchem.8b03099.
 34. Van Soest, P.J.; McQueen, R.W. The Chemistry and Estimation of Fibre. *Proc. Nutr. Soc.* **1973**, *32*, 123–130, doi:10.1079/PNS19730029.
 35. Chambers, M.C.; Maclean, B.; Burke, R.; Amodei, D.; Ruderman, D.L.; Neumann, S.; Gatto, L.; Fischer, B.; Pratt, B.; Egertson, J.; et al. A Cross-Platform Toolkit for Mass Spectrometry and Proteomics. *Nat Biotechnol* **2012**, *30*, 918–920, doi:10.1038/nbt.2377.
 36. Pluskal, T.; Castillo, S.; Villar-Briones, A.; Orešič, M. MZmine 2: Modular Framework for Processing, Visualizing, and Analyzing Mass Spectrometry-Based Molecular Profile Data. *BMC Bioinformatics* **2010**, *11*, 395, doi:10.1186/1471-2105-11-395.
 37. Myers, O.D.; Sumner, S.J.; Li, S.; Barnes, S.; Du, X. One Step Forward for Reducing False Positive and False Negative Compound Identifications from Mass Spectrometry Metabolomics Data: New Algorithms for Constructing Extracted Ion Chromatograms and Detecting Chromatographic Peaks. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 8696–8703, doi:10.1021/acs.analchem.7b00947.
 38. Elie, N.; Santerre, C.; Touboul, D. Generation of a Molecular Network from Electron Ionization Mass Spectrometry Data by Combining MZmine2 and MetGem Software. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 11489–11492, doi:10.1021/acs.analchem.9b02802.
 39. Perrot, T.; Salzet, G.; Amusant, N.; Beauchene, J.; Gérardin, P.; Dumarçay, S.; Sormani, R.; Morel-Rouhier, M.; Gelhaye, E. A Reverse Chemical Ecology Approach to Explore Wood Natural Durability. *Microb. Biotechnol.* **2020**, *14*, 317, doi:10.1111/1751-7915.13540.
 40. Blanchette, R.A. Delignification by Wood-Decay Fungi. *Annual Reviews in Phytopathology* **1991**, *29*, 381–398.
 41. Perrot, T.; Schwartz, M.; Deroy, A.; Girardet, J.-M.; Kohler, A.; Morel-Rouhier, M.; Favier, F.; Gelhaye, E.; Didierjean, C. Diversity of Omega Glutathione Transferases in Mushroom-Forming Fungi Revealed by Phylogenetic, Transcriptomic, Biochemical and Structural Approaches. *Fungal Genetics and Biology* **2021**, *148*, 103506, doi:10.1016/j.fgb.2020.103506.
 42. Pacetti, A.; Moretti, S.; Perrin, C.; Gelhaye, E.; Bieler, E.; Kassemeyer, H.-H.; Mugnai, L.; Farine, S.; Bertsch, C. Grapevine Wood-Degrading Activity of *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch.: A Focus on the Enzymatic Pathway Regulation. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 844264, doi:10.3389/fmicb.2022.844264.
 43. Cornwell, W.K.; Cornelissen, J.H.C.; Allison, S.D.; Bauhus, J.; Eggleton, P.; Preston, C.M.; Scarff, F.; Weedon, J.T.; Wirth, C.; Zanne, A.E. Plant Traits and Wood Fates across the Globe: Rotted, Burned, or Consumed? *Global Change Biology* **2009**, *15*, 2431–2449, doi:10.1111/j.1365-2486.2009.01916.x.
 44. Bruez, E.; Cholet, C.; Giudici, M.; Simonit, M.; Martignon, T.; Boisseau, M.; Weingartner, S.; Poitou, X.; Rey, P.; Geny-Denis, L. Pruning Quality Effects on Desiccation Cone Installation and Wood Necrotization in Three Grapevine Cultivars in France. *Horticulturae* **2022**, *8*, 681, doi:10.3390/horticulturae8080681.

45. 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*, 472–287, doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-22025.
46. Chong, J.; Poutaraud, A.; Huguene, P. Metabolism and Roles of Stilbenes in Plants. *Plant Science* **2009**, *177*, 143–155, doi:10.1016/j.plantsci.2009.05.012.
47. Gabaston, J.; Leborgne, C.; Waffo-Teguo, P.; Valls, J.; Palos Pinto, A.; Richard, T.; Cluzet, S.; Méryllon, J. Wood and Roots of Major Grapevine Cultivars and Rootstocks: A Comparative Analysis of Stilbenes by UHPLC-DAD-MS/MS and NMR. *Phytochemical Analysis* **2019**, *30*, 320–331, doi:10.1002/pca.2815.
48. Aisyah, S.; Gruppen, H.; Slager, M.; Helmink, B.; Vincken, J.-P. Modification of Prenylated Stilbenoids in Peanut (*Arachis Hypogaea*) Seedlings by the Same Fungi That Elicited Them: The Fungus Strikes Back. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 9260–9268, doi:10.1021/acs.jafc.5b03570.
49. Hammerbacher, A.; Schmidt, A.; Wadke, N.; Wright, L.P.; Schneider, B.; Bohlmann, J.; Brand, W.A.; Fenning, T.M.; Gershenzon, J.; Paetz, C. A Common Fungal Associate of the Spruce Bark Beetle Metabolizes the Stilbene Defenses of Norway Spruce. *Plant Physiology* **2013**, *162*, 1324–1336, doi:10.1104/pp.113.218610.
50. Tian, B.; Liu, J. Resveratrol: A Review of Plant Sources, Synthesis, Stability, Modification and Food Application. *J. Sci. Food Agric.* **2020**, *100*, 1392–1404, doi:10.1002/jsfa.10152.
51. Zhang, J.-Q.; Li, G.-P.; Kang, Y.-L.; Teng, B.-H.; Yao, C.-S. Biomimetic Synthesis of Resveratrol Trimers Catalyzed by Horseradish Peroxidase. *Molecules* **2017**, *22*, 819, doi:10.3390/molecules22050819.
52. Rodríguez-Bonilla, P.; Méndez-Cazorla, L.; López-Nicolás, J.M.; García-Carmona, F. Kinetic Mechanism and Product Characterization of the Enzymatic Peroxidation of Pterostilbene as Model of the Detoxification Process of Stilbene-Type Phytoalexins. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 100–108, doi:10.1016/j.phytochem.2010.10.009.
53. Bassanini, I.; Ferrandi, E.E.; Riva, S.; Monti, D. Biocatalysis with Laccases: An Updated Overview. *Catalysts* **2020**, *11*, 26, doi:10.3390/catal11010026.
54. Middelhoven, W.J. Catabolism of Benzene Compounds by Ascomycetous and Basidiomycetous Yeasts and Yeastlike Fungi: A Literature Review and an Experimental Approach. *Antonie van Leeuwenhoek* **1993**, *63*, 125–144, doi:10.1007/BF00872388.
55. Harwood, C.S.; Parales, R.E. THE β -KETOADIPATE PATHWAY AND THE BIOLOGY OF SELF-IDENTITY. *Annu. Rev. Microbiol.* **1996**, *50*, 553–590, doi:10.1146/annurev.micro.50.1.553.
56. Barbier, M.; Perrot, T.; Salzet, G.; Amusant, N.; Ger, P. Glutathione Transferases: Surrogate Targets for Discovering Biologically Active Compounds. *Journal of Natural Products* **2020**, *7*, A-G, doi:10.1021/acs.jnatprod.0c00480.
57. Jeandet, P.; Douillet-Breuil, A.-C.; Bessis, R.; Debord, S.; Sbaghi, M.; Adrian, M. Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2731–2741, doi:10.1021/jf011429s.
58. Jeandet, P.; Delaunois, B.; Conreux, A.; Donnez, D.; Nuzzo, V.; Cordelier, S.; Clément, C.; Courrot, E. Biosynthesis, Metabolism, Molecular Engineering, and Biological Functions of Stilbene Phytoalexins in Plants. *BioFactors* **2010**, *36*, 331–341, doi:10.1002/biof.108.
59. Breuil, A.-C.; Jeandet, P.; Adrian, M.; Chopin, F.; Pirio, N.; Meunier, P.; Bessis, R. Characterization of a Pterostilbene Dehydrodimer Produced by Laccase of *Botrytis Cinerea*. *Phytopathology*® **1999**, *89*, 298–302, doi:10.1094/PHYTO.1999.89.4.298.

60. Hoang, M.H.; Nguyen, T.A.T.; Pham, N.K.T.; Dang, V.S.; Vo, T.N. A New Oleanane-Skeleton Triterpene Isolated from *Coffea Canephora*. *Natural Product Research* **2022**, *36*, 5161–5167, doi:10.1080/14786419.2021.1921767.
61. Prodhomme, D.; Valls Fonayet, J.; Hévin, C.; Franc, C.; Hilbert, G.; de Revel, G.; Richard, T.; Ollat, N.; Cookson, S.J. Metabolite Profiling during Graft Union Formation Reveals the Reprogramming of Primary Metabolism and the Induction of Stilbene Synthesis at the Graft Interface in Grapevine. *BMC Plant Biol* **2019**, *19*, 599, doi:10.1186/s12870-019-2055-9.
62. Gericke, O.; Fowler, R.M.; Heskes, A.M.; Bayly, M.J.; Semple, S.J.; Ndi, C.P.; Stärk, D.; Løland, C.J.; Murphy, D.J.; Buirchell, B.J.; et al. Navigating through Chemical Space and Evolutionary Time across the Australian Continent in Plant Genus *Eremophila*. *Plant J* **2021**, *108*, 555–578, doi:10.1111/tpj.15448.
63. Le Roy, J.; Huss, B.; Creach, A.; Hawkins, S.; Neutelings, G. Glycosylation Is a Major Regulator of Phenylpropanoid Availability and Biological Activity in Plants. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, doi:10.3389/fpls.2016.00735.
64. Siebers, M.; Brands, M.; Wewer, V.; Duan, Y.; Hölzl, G.; Dörmann, P. Lipids in Plant–Microbe Interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2016**, *1861*, 1379–1395, doi:10.1016/j.bbalip.2016.02.021.
65. Warnecke, D.; Heinz, E. Recently Discovered Functions of Glucosylceramides in Plants and Fungi. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 919–941, doi:10.1007/s00018-003-2243-4.
66. Langseter, A.M.; Dzurendova, S.; Shapaval, V.; Kohler, A.; Ekeberg, D.; Zimmermann, B. Evaluation and Optimisation of Direct Transesterification Methods for the Assessment of Lipid Accumulation in Oleaginous Filamentous Fungi. *Microb Cell Fact* **2021**, *20*, 59, doi:10.1186/s12934-021-01542-1.
67. Bengtsson, J.D.; Wallis, J.G.; Browse, J. Lipid Isolation from Plants. In *Plant Lipids*; Bartels, D., Dörmann, P., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer US: New York, NY, 2021; Vol. 2295, pp. 3–13 ISBN 978-1-07-161361-0.
68. Boutegrabet, L.; Kanawati, B.; Gebefügi, I.; Peyron, D.; Cayot, P.; Gougeon, R.D.; Schmitt-Kopplin, P. Attachment of Chloride Anion to Sugars: Mechanistic Investigation and Discovery of a New Dopant for Efficient Sugar Ionization/Detection in Mass Spectrometers. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 13059–13067, doi:10.1002/chem.201103788.
69. Ingólfssdóttir, K.; Breu, W.; Huneck, S.; Gudjonsdóttir, G.A.; Müller-Jakic, B.; Wagner, H. In Vitro Inhibition of 5-Lipoxygenase by Protolichesterinic Acid from *Cetraria Islandica*. *Phytomedicine* **1994**, *1*, 187–191, doi:10.1016/S0944-7113(11)80063-2.
70. Goel, M.; Dureja, P.; Rani, A.; Uniyal, P.L.; Laatsch, H. Isolation, Characterization and Antifungal Activity of Major Constituents of the Himalayan Lichen *Parmelia Reticulata* Tayl. †. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 2299–2307, doi:10.1021/jf1049613.

2. Etude de la dégradation du bois de vigne, hêtre et chêne en bûchettes par *F. mediterranea*: analyses complémentaires (exsudats)

Au cours des expériences présentées dans ce chapitre, la formation de gouttelettes plus ou moins colorées, appelées exsudats, a été observée à la surface des mycéliums dans certaines boîtes de culture, en particulier celles des deux souches de Fmed en présence de bûchettes de vigne, de chêne et de hêtre (Figure 27a-e). Pas ou très peu d'exsudats (moins d'une dizaine de μL sur l'ensemble des boîtes de culture) ont été observés à la surface du mycélium de Tver BRFM1532. Ce phénomène d'exsudation avait déjà été observé dans des cultures de Tver, et une forte variabilité intraspécifique a été observée, certaines souches étant considérées comme sécrétrices d'exsudats contrairement à d'autres (Deroy, 2015). Des cultures de la souche Tver BRFM1218, considérée comme sécrétrice d'exsudat d'après des expériences précédentes (Deroy, 2015), ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles présentées dans ce chapitre. En présence de bûchettes de vigne, des exsudats ont également été observés à la surface du mycélium de Tver BRFM1218 (Figure 28). Les exsudats ont été observés à partir de 14 jours de culture minimum, et récoltés entre 1 et 7 mois de culture. Les volumes récoltés étaient les plus importants pour les cultures de Fmed LR124 en présence de vigne (jusqu'à environ 1,5 mL dans une des boîtes de culture) et de Fmed phco36 en présence de chêne et de vigne (entre 20 μL et 1 mL par boîte de culture). Pour les autres conditions, de très faibles volumes (quelques μL par boîte pour Fmed LR124 à environ 250 μL par boîte pour Fmed phco36) ont été récoltés. Afin d'explorer leurs compositions métabolomiques, les exsudats récoltés tout au long des cultures ont été rassemblés par condition et lyophilisés. De moins de 100 μg jusqu'à 17,9 mg secs par condition ont été obtenus après lyophilisation, et repris à 1mg/mL dans du méthanol (HPLC-grade) afin de les analyser par HPLC-QTOF-MS/MS, selon le même protocole que décrit dans ce chapitre (publication n°3, en partenariat avec l'équipe de spectrométrie de masse à l'ICSN (CNRS, Gif-sur-Yvette). Les données MS/MS obtenues ont été prétraitées à l'aide de MZMine 2.53 (Pluskal et al., 2010), selon les paramètres décrits précédemment, puis représentées graphiquement grâce à l'algorithme *t*-SNE (avec un cosinus score minimal de 0.75) à l'aide du logiciel MetGem (Olivon et al., 2018; Elie et al., 2019) (<https://metgem.github.io/>). Afin d'enrichir le graphe *t*-SNE et donc pour améliorer l'annotation des métabolites rencontrés dans les exsudats, les données d'extraits de certaines bûchettes (issues des expérimentations présentées dans la publication n°3) sont également représentées dans le graphe (Annexe 5). Cette représentation graphique a permis d'annoter un certain nombre

de métabolites contenus dans les exsudats, dont des acides aminés ou dérivés, des composés phénoliques, des glucides, des stéroïdes et des terpénoïdes.

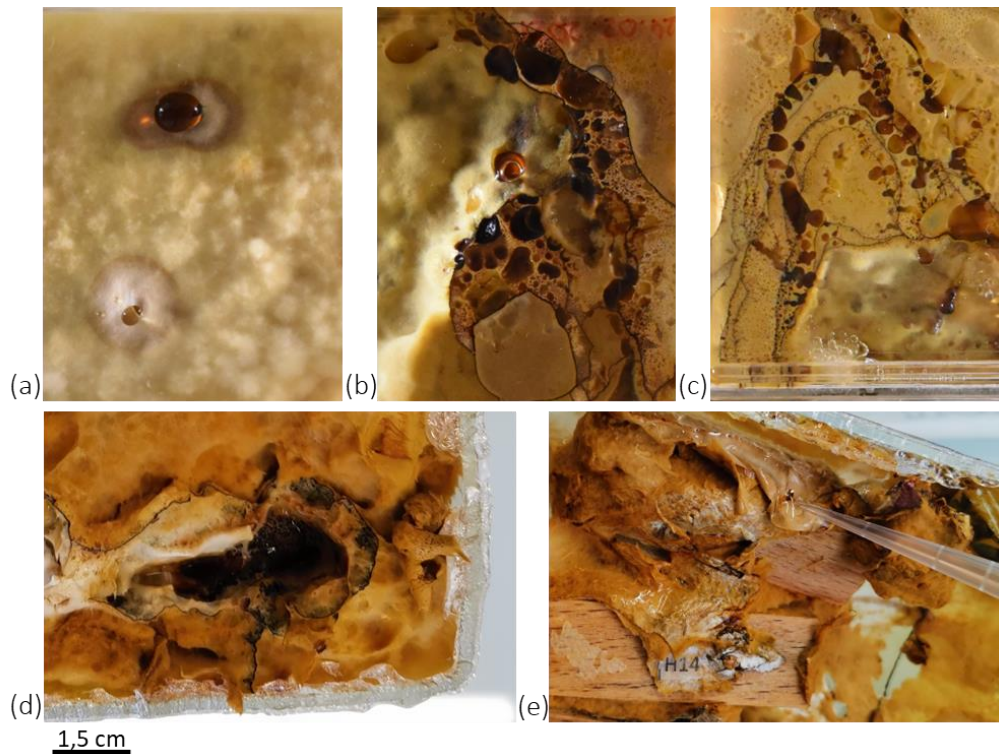


Figure 27: photographies d'exsudats observés à la surface du mycélium de (a-b) *Fmed LR124* et (c-e) *Fmed phco36* en présence de bûchettes de chêne (a), vigne (b-d) et hêtre (e) après 7 mois de culture à 27°C. (©Muriel Barbier)

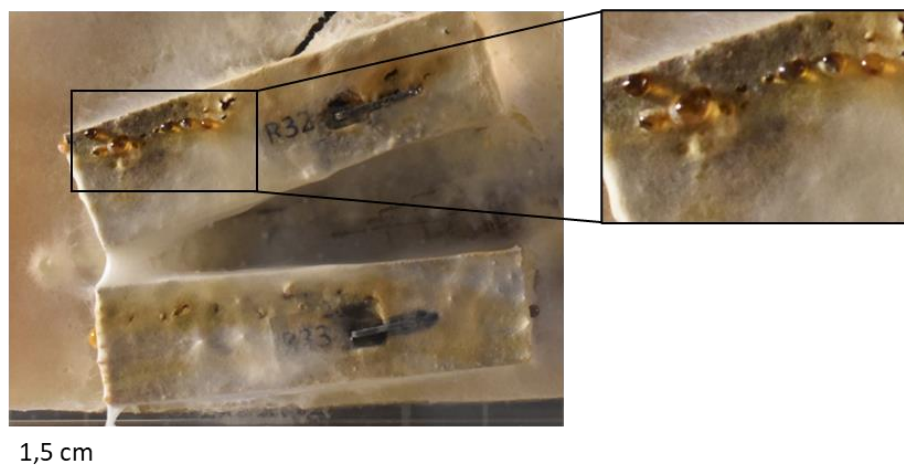


Figure 28: photographie d'exsudats observés à la surface du mycélium de *Tver BRFM1218* en présence de bûchettes de vigne après 7 mois de culture à 27°C. (©Muriel Barbier)

Ce phénomène d'exsudation est connu pour les champignons filamenteux et son apparition dépend notamment de l'espèce fongique et des conditions de culture ou environnementales (Krain and Siupka, 2021). Il pourrait avoir plusieurs rôles, encore peu compris, notamment dans la détoxification, par l'accumulation et donc l'externalisation de molécules toxiques, ou dans la croissance fongique en tant que réservoir d'eau (Krain and Siupka, 2021). Les exsudats

fongiques sont généralement composés de protéines impliquées dans la dégradation, la détoxification ou la réponse à un stress, et de métabolites spécialisés pouvant avoir des activités biologiques (antimicrobiennes, phytotoxiques, anticancéreuses, ...). Lors de l'observation de ce phénomène dans des cultures de différentes souches de Tver, des activités glucuronidase, glucosidase et laccase ont été observées (Deroy, 2015). Une analyse protéomique a montré une composition proche de celle du sécrétome de Tver, avec notamment des CAZYmes, des oxydoréductases (dont des peroxydases), des peptidases et d'autres protéines telles que des GSTs. Ces résultats sont cohérents avec d'autres études protéomiques d'exsudats, notamment de plusieurs *Ascomycota* dont des espèces pathogènes (dont *Sclerotinia ginseng* - *Sclerotiniaceae*, ou des espèces du genre *Penicillium* – *Trichocomaceae*), dans lesquelles principalement des CAZYmes, probablement impliquées dans l'assimilation du carbone et dans des processus d'auto-recyclage, des oxydoréductases mais également des défensines aux propriétés antifongiques ou encore d'autres protéines impliquées dans le transport, la signalisation ou la détoxification ont été identifiées (Krain and Siupka, 2021).

Parmi les métabolites identifiés dans les exsudats (Annexe 5), certains pourraient correspondre à des fragments de peptaïbols. Les peptaïbols sont de courtes chaînes peptidiques linéaires formées d'acides aminés non-protéinogènes, tels que la proline, l'isovaline ou l'alanine (Daniel and Rodrigues Filho, 2007; Duclouhier, 2010). Ils ont été principalement identifiés à partir de culture de *Trichoderma* sp. et ont des propriétés antibiotiques. Des acides phénoliques (tannique, férulique, oxalique entre autres) ont également été identifiés dans des exsudats de *Sclerotium rolfsii* (syn. *Athelia rolfsii*, *Basidiomycota*, *Agaricomycetes*, *Atheliaceae*), un champignon pathogène de nombreuses plantes cultivées, présent dans le sol et en particulier dans les zones tropicales et subtropicales (Pandey et al., 2007). Ces composés contribuent aux propriétés antifongiques démontrées pour certains exsudats. Des acides gras, glucides, acides carboxyliques et acides aminés ont également été identifiés dans des exsudats de *Rhizoctonia solani* (*Basidiomycota*, *Cantharellales*, *Ceratobasidicaeae*), un champignon pathogène de différentes plantes cultivées et présent dans le sol (Aliferis and Jabaji, 2010). Un glucide, le tréhalose, a été annoté (score de correspondance de 0,94 avec le standard de la base de données GNPS- NIST14 [M+NH₄]⁺) dans deux échantillons d'exsudats : celui produit par Fmed phco36 en présence de bois de vigne et celui produit par Tver BRFM1218 en présence de bois de vigne. Ce composé fongique est connu pour son rôle de réserve mais aussi dans la tolérance au stress et dans la pathogénicité (Doehlemann et al., 2006; Aliferis and Jabaji, 2010). Parmi les autres familles de métabolites identifiées dans les exsudats on trouve également probablement des terpénoïdes : leurs spectres de fragmentation sont en effet proches de ceux du curcumol, de la

Chapitre 2

longicamphenylone ou du zerumbone. Les terpénoïdes font partie des métabolites spécialisés qui peuvent être synthétisés par les champignons, et certains ont déjà été identifiés dans des exsudats. Des tricothécènes par exemples, une classe de sesquiterpénoïdes, ont été identifiés dans des exsudats de *Stachybotrys chartraum*, un champignon pathogène présent dans les constructions (Gareis and Gottschalk, 2014), et sont également produits par le genre *Trichoderma*, connu pour son intérêt en tant qu'agent de biocontrôle (Kumari and Srividhya, 2020). Ce sont des mycotoxines mais ils peuvent également avoir des propriétés antifongiques et cytotoxiques (de Carvalho et al., 2015).

Transition

Dans le premier chapitre, nous avons étudié la capacité de Fmed à dégrader le bois de vigne sain réduit en sciure, en la comparant à celle sur sciure de bois de hêtre et d'épicéa. Il s'agissait de mettre en évidence des mécanismes de dégradation et/ou de détoxification de ce champignon spécifiques à la composition chimique du bois de vigne. Les premiers résultats concernent uniquement une souche de chaque espèce : pour celles-ci, la sciure de bois de vigne est effectivement dégradée par Fmed davantage que celle de bois de hêtre et encore davantage que la sciure de bois d'épicéa. Néanmoins, le champignon de pourriture blanche utilisé comme modèle (Tver) est lui aussi capable de dégrader la sciure de bois de vigne au moins autant que celle de bois de hêtre, et autant que Fmed. Les deux espèces de champignons sont capables de dégrader l'ensemble des extractibles détectés dans les bois de vigne et de hêtre (stilbènes et flavonoïdes), et adoptent toutes les deux un schéma de dégradation de type simultané sur les deux substrats. Enfin, Fmed est capable de réguler la composition de son sécrétome en fonction de son substrat, puisqu'il sécrète davantage d'oxydoréductases (principalement des MnPs et des laccases) sur bois de vigne que sur bois de hêtre. Afin de compléter ces résultats, certaines des expérimentations ont été réalisées avec une souche supplémentaire de chaque espèce. Les deux souches de Fmed adoptent des comportements similaires alors que les deux souches de Tver ont des différences phénotypiques marquées : la souche Tver BRFM1532 dégrade encore davantage la sciure de bois de vigne que Tver BRFM1218 et que les deux souches de Fmed. Des dosages de l'ergostérol dans les cultures sur sciure de vigne et de hêtre ont permis d'observer une augmentation de la biomasse fongique au cours des cultures, sauf pour la souche Tver BRFM1218 le 3^{ème} mois de culture sur vigne. En conclusion de ce premier chapitre, aucun trait propre à Fmed lui conférant un avantage à croître et à dégrader la sciure de vigne n'a pu être mis en évidence.

Dans le deuxième chapitre, la structure tridimensionnelle du bois a été prise en compte pour comparer la capacité de Fmed à dégrader des bûchettes de bois de vigne, hêtre et chêne sains. Les compositions structurales et métabolomiques du substrat et du mycélium ont pour cela été suivies. Contrairement à ce qui a été observé sur sciures, une importante variabilité entre les deux souches de Fmed étudiées (phco36 et LR124, deux souches isolées de bois de vigne) a été observée. Une seule souche de Tver (BRFM1532) a été utilisée comme modèle. Le taux de dégradation du bois de vigne exposé à Fmed phco36 est supérieur à celui du bois de hêtre et à celui du bois de vigne dégradé par Tver. Une importante variabilité est également observée entre les taux de dégradation des bûchettes de bois de vigne exposées à Fmed LR124. Celle-ci

Transition

pourrait être due à une hétérogénéité au sein du bois de vigne. Une tendance vers un taux de dégradation plus important (46%) que celui du bois de vigne exposé à Tver (31%) est observée. Fmed semble donc présenter un avantage par rapport à Tver dans la dégradation de la structure tridimensionnelle du bois de vigne, mais des expériences complémentaires sont nécessaires.

Par ailleurs, le bois de vigne n'est pas le bois pour lequel le taux de dégradation est le plus important. Pour les trois souches étudiées, une partie du bois de chêne, celle pour laquelle la densité initiale était la plus faible (inférieure à 0,60), est le substrat le plus dégradé. Pour le bois de chêne, la densité initiale des bûchettes jouait un rôle majeur sur le taux de dégradation. Les bûchettes plus denses (densité supérieure à 0,60) n'ont été dégradées par aucune des trois souches fongiques. Ceci est cohérent avec de précédentes recherches montrant que la densité joue un rôle sur la durabilité du bois, et que cet effet dépend de l'espèce de bois considérée (Perrot et al., 2020). Lors d'analyses complémentaires (données non présentées, analyses réalisées par UHPLC-TQ-MS et GC-MS en collaboration avec le LERMAB), aucune différence de composition en extractibles n'a été observé entre les bûchettes peu dégradées (initialement plus denses) ou très dégradées (initialement peu denses), suggérant que la densité seule du bois de chêne a influencé sa durabilité. La densité d'un bois est généralement liée à son espèce, les bois de feuillus ayant des densités généralement plus élevées (supérieures à 0,5) que les bois de résineux (inférieures à 0,5) (Martínez-Sancho et al., 2020). Cependant, des différences de densité peuvent être dues à d'autres facteurs. Bouriaud et al., (2004) ont montré que dans un tronc de bois de hêtre, la densité du bois varie de 300 à 900 kg/m³ (soit 0,3 à 0,9 g/cm³) selon la position au sein d'une cerne annuelle et selon l'âge du bois. Des variations de densité, plus faibles mais non-négligeables, ont également été corrélées à des modifications de la température, de la teneur en eau du sol, ou du génotype de chaque individu. Une faible différence (entre 5 et 8%) est également observée entre l'aubier (moins dense) et le bois de cœur de bois de chêne dont le bois de cœur est visuellement plus coloré (Koman and Feher, 2015). Il est intéressant de noter que l'influence de la densité sur le taux de dégradation du bois n'a pas été observé^e pour les bûchettes de bois de vigne. Les bûchettes de bois de vigne et de hêtre avaient elles-aussi des densités hétérogènes, mais aucune corrélation entre celles-ci et le taux de dégradation des bûchettes n'a été observée. La durabilité du bois de vigne ne semble donc pas corrélée à sa densité du moins dans les conditions de l'expérience.

Dans le deuxième chapitre également, il a été observé que la souche Fmed LR124 produit davantage de mycélium après 7 mois en présence de bois de vigne que de bois de chêne (toutes densités confondues), et davantage que Tver en présence de bois de vigne. La souche Fmed phco36 montre une tendance similaire mais la variabilité entre répétitions n'a pas permis de

Transition

montrer un trait de l'espèce *Fmed*. Pour les deux souches de *Fmed*, tout comme observé sur sciure, une dégradation de type simultanée est observée sur les trois espèces de bois. Au contraire, *Tver* adopte ce schéma de dégradation sur vigne et sur chêne également mais sur bois de hêtre, un schéma de dégradation de type sélectif (ou préférentiel) est suggéré.

L'analyse métabolomique non-ciblée réalisée dans le chapitre 2 a permis de suggérer des mécanismes spécifiques ou au moins plus marqués dans le mycélium de *Fmed* en présence de bois de vigne, tels que la dégradation et/ou l'oligomérisation de stilbènes, mais également des marqueurs de composition du mycélium différents en fonction du substrat ou de l'espèce fongique. Cependant, une importante variabilité intraspécifique et entre individus a été observée et davantage d'expérimentations sont nécessaires. Les résultats d'analyses protéomiques, réalisées dans l'objectif de connaître la composition des sécrétomes de *Fmed* et de *Tver* sur les différentes bûchettes de bois, sont encore en attente et devraient également apporter davantage de précisions sur les mécanismes de dégradation du bois mis en œuvre par les champignons.

Pour conclure, la structure du bois de vigne, sous forme de sciure ou de bûchette, ne suffit pas à expliquer la présence privilégiée de *Fmed* au sein du bois de vigne au vignoble. D'autres facteurs qui font partie des caractéristiques de cette niche écologique entrent donc probablement en compte, tels que la température, les teneurs en éléments nutritifs, ou la compétitivité face à d'autres espèces microbiennes.

Discussion générale

1. Importance des facteurs biotiques pour l'adaptation de *F. mediterranea*

1.1. Réponse du bois de vigne : effet antifongique et détoxification des extractibles de bois de vigne

Dans les expériences réalisées dans les chapitres 1 et 2, du bois de vigne sain a été soumis *in vitro* à la présence de deux souches de Fmed et du champignon de pourriture blanche modèle Tver. Ces modèles expérimentaux présentent l'avantage de pouvoir contrôler les différents paramètres environnementaux, afin d'étudier spécifiquement les mécanismes de dégradation propres aux bois et aux souches étudiées. Cependant, ils ne sont pas représentatifs des conditions réelles dans lesquelles évolue Fmed, en particulier le bois de vigne au vignoble. En réponse à l'attaque d'un agent pathogène, le bois de vigne est capable de produire et d'accumuler des extractibles, en particulier des stilbènes, aux propriétés antifongiques. Dans le bois sain (ensemble des parties aériennes) de divers cv. ('Merlot', 'Cabernet-Sauvignon', 'Chardonnay', 'Tannat', 'Chenin blanc', 'Gamay noir', 'Sauvignon blanc' et 'Cabernet franc'), les teneurs totales en stilbénoides varient de 3,4 à 25,1 g/kg ms (Gabaston et al., 2019). Dans le bois de ceps des cv. 'Gewurztraminer' et 'Riesling', les teneurs rapportées dans la littérature sont respectivement de $4,201^{+/-919}$ à $7,857^{+/-498}$ g/kg ms (Vergara et al., 2012) et de 4,321 g/kg ms (Lambert et al., 2013). En comparaison, ces teneurs pour un cultivar considéré comme moins sensible à l'Esca, le Pinot noir, varient entre $1,492^{+/-143}$ et 8,485 g/kg ms (Vergara et al., 2012; Lambert et al., 2013). Ces variations peuvent être dues notamment à des paramètres environnementaux ou culturels. Dans les nécroses brunes au sein du bois de ceps de cultivar Cabernet-Sauvignon âgé de 12 ans, les teneurs en stilbènes sont de 3 à 9 fois plus élevées (de 0,5 à 1,8 mg/kg mf) que dans le bois sain (de 0,1 à 0,6 mg/kg mf) (Rusjan et al., 2017). Ces teneurs sont également plus élevées dans le bois sain des ceps symptomatiques (0,3 à 0,6 mg/kg mf) que des ceps asymptomatiques (0,1 à 0,2 mg/kg mf). Dans le bois d'un cep symptomatique de l'Esca de cv. 'Sangiovese', des teneurs trois fois plus importantes en stilbènes dans les parties nécrosées (37 g/kg ms) que dans les parties saines (12 g/kg ms) ont été rapportées (Amalfitano et al., 2011). Il est donc raisonnable de considérer que les concentrations en stilbènes dans les bois de vigne utilisés dans nos expérimentations ('Gewurztraminer' 'en sciure et 'Riesling' en bûchettes) étaient relativement faibles par rapport aux concentrations auxquelles peuvent être exposées les espèces fongiques associées à l'Esca, en particulier Fmed.

Discussion

Il serait intéressant d'étudier l'effet d'une augmentation de la concentration ou d'une modification de la composition en stilbènes dans le bois exposé à Fmed. Des expériences similaires mais réalisées à partir de bois nécrosé (nécroses brunes) par exemple pourraient compléter les résultats obtenus. Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier plus précisément l'effet propre aux extractibles du bois de vigne, ainsi que les mécanismes mis en œuvre par Fmed face à ces extractibles, à différentes concentrations. Des résultats préliminaires (Jean Mourot, stage de L3) ont été réalisés à partir d'extraits (extraction Ethanol:eau 80:20 assistée au Soxtherm[®]) de bois de vigne cv. 'Gewurztraminer' et 'Riesling', issus des mêmes lots que ceux utilisés dans les chapitres 1 et 2, et de bois de vigne cv. 'Pinot noir' (tronc écorcé, parties saines et nécrosées confondues, réduit en poudre). Les extractibles ont été ajoutés au milieu de culture à différentes concentrations (1, 5 et 10 mg/mL) à une extrémité du milieu de culture (Figure 29). L'activité inhibitrice des extractibles a été évaluée en mesurant la vitesse de croissance du mycélium depuis l'*inoculum* vers l'extrémité opposée. Le dispositif expérimental a été choisi de façon à pouvoir également étudier le devenir des extractibles à différentes distances du mycélium (zones « A » à « D », Figure 29). Aucune activité antifongique n'a été observée aux concentrations testées (Figure 30). Ceci pourrait être expliqué par la nature des stilbènes extraits et leur concentration, qui n'auraient pas suffisamment d'activité antifongique. Peu d'études rapportent des activités antifongiques de stilbénoides envers Fmed. Sur 24 extractibles du bois de vigne dont 11 stilbénoides, des activités fongistatiques ont été reportées uniquement pour les vitisines A et B, la *trans*-ptérostilbène, le miyabenol C et l'isohopéphénol, inhibant 20% de la croissance de Fmed à 500 μ M – soit respectivement 0,5 (pour les deux vitisines), 0,1, 0,3 et 0,5 mg/mL (Lambert et al., 2012). Il est donc possible que la nature et la concentration des stilbènes (calculée en extractibles totaux, principalement des stilbénoides) utilisées lors de nos expérimentations n'aient pas eu d'activité antifongique envers Fmed. Concernant Tver, l'oxyresvératrol, le resvératrol et le picéatannol inhibent sa croissance à des IC₅₀ de respectivement 9,9, 2,3 et 4,3 mg/mL (Schultz et al., 1995). Il est possible que la concentration de chacun des stilbénoides présents dans nos extraits ne suffise pas à exercer une activité fongique. De plus, les stilbénoides peuvent être rapidement dégradés une fois isolés, en présence d'oxygène et en fonction de leur structure chimique, de la température ou du pH (Willenberg et al., 2012; Tian and Liu, 2020). Ils ont donc pu perdre de leurs activités antifongiques ou être dégradés naturellement une fois isolés, et leurs concentrations dans les milieux de culture lors de nos expérimentations ont pu être surestimées. Il est enfin également possible que Fmed et Tver aient détoxiqué les extractibles présents. Cette hypothèse a été

Discussion

explorée par l'analyse qualitative des extraits initiaux et des différentes zones du milieu de culture par LC-MS (en collaboration avec le LERMAB).

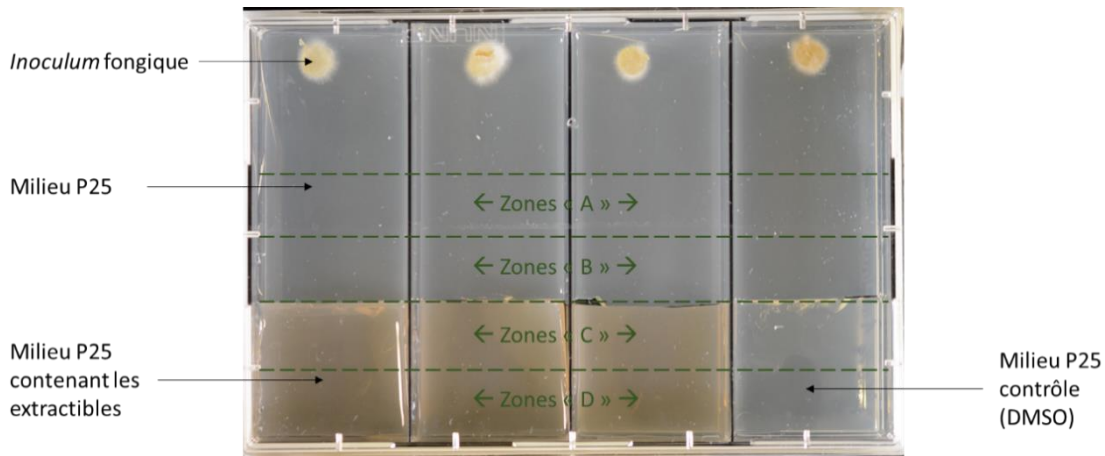


Figure 29: dispositif expérimental mis en place pour observer les effets des extractibles du bois de vigne à distance du mycélium de Fmed et Tver. (© Jean Mourot)

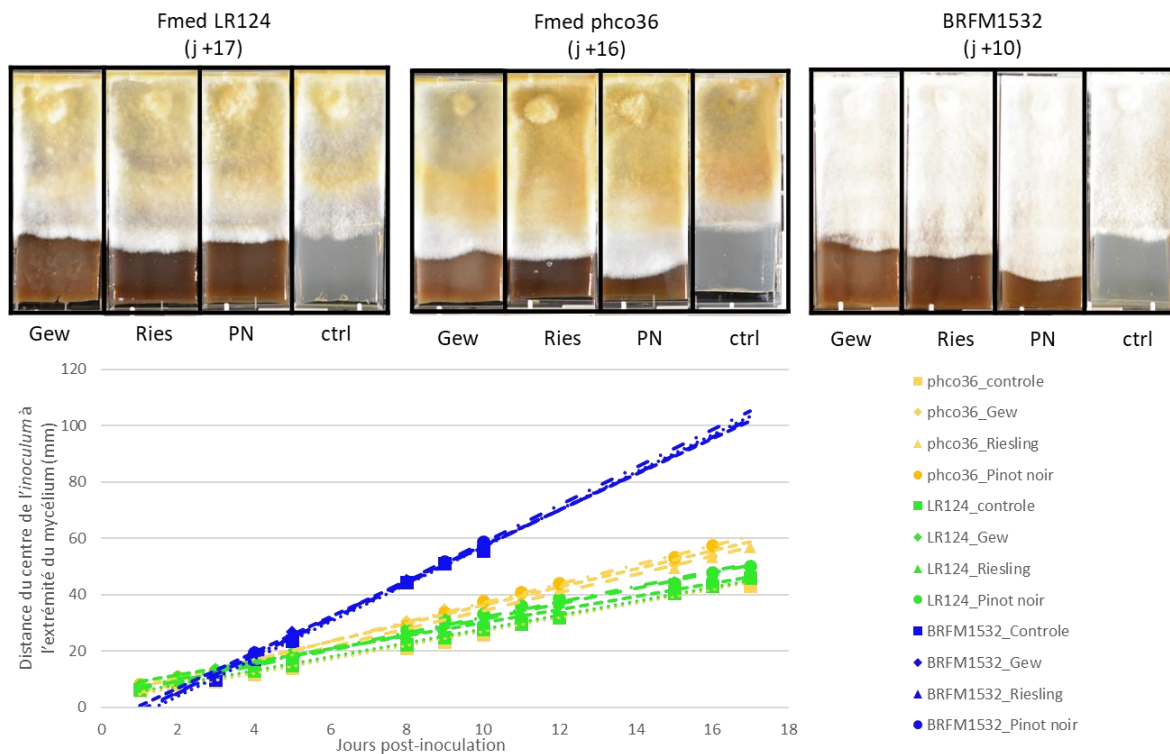


Figure 30: morphologies et distances du centre de l'inoculum à l'extrémité du mycélium (avec courbes de régression linéaire pour chaque condition) des cultures de Fmed LR124, phco36 et Tver BRFM1532 en présence d'extractibles de bois de vigne cv. 'Gewurztraminer' (Gew), 'Riesling' (Ries) ou 'Pinot noir' (PN) à 10mg/mL ou en l'absence d'extractibles (ctrl) après 10 à 17 jours de culture à 27°C. (© Jean Mourot)

Les zones « A » à « D » après croissance du mycélium (jusqu'en zone « C ») ont été prélevées et extraites à l'acétate d'éthyle puis repris dans le méthanol pour analyses LC-MS à l'aide d'une chaîne UHPLC LC-20A triple-quadrupôle ESI LC-MS 8030 Shimadzu (Noisiel, France), en collaboration avec le LERMAB (Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy). Le

Discussion

resvératrol, l'*epsilon*-viniférine et probablement un tétramère de stilbène (m/z 904,9 [M-H]⁻) ont été annotés d'après un échantillon de bois de vigne cv. 'Gewurztraminer' dont la composition était connue, d'après les m/z et temps de rétention des extractibles (Figure 31). Ces trois composés étaient présents initialement dans chacun des extraits testés ('Gewurztraminer', 'Riesling' et 'Pinot noir'). Après croissance du mycélium jusqu'en zone C (Figure 31), ils étaient également présents dans les zones B, C et D du milieu de culture. La proportion relative des oligomères était plus importante par rapport au resvératrol dans le milieu de culture après croissance du mycélium (très peu de resvératrol détecté). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces observations. Le resvératrol initialement présent a pu être oxydé et oligomérisé soit de façon naturelle soit sous l'action d'enzymes fongiques. Il a également pu être dégradé par les champignons, contrairement aux ou moins que les oligomères. Des analyses complémentaires sont nécessaires, notamment avec des quantités d'extractibles plus importantes afin d'augmenter la résolution des analyses, et pour permettre la quantification des extractibles. De plus, la présence de stilbènes dans la zone B peut être due soit à une diffusion dans le milieu soit à une métabolisation dans le mycélium. Il serait intéressant d'étudier plus précisément la localisation des stilbènes dans cette zone, à l'aide d'outils d'imagerie ou de marquage des métabolites. Ces expériences préliminaires ont avant tout permis de proposer un nouveau protocole expérimental permettant de prendre en compte la dimension spatiale d'un effet antifongique et des activités de détoxification *in vitro* des extractibles, et nécessitent d'être répétées et complétées.

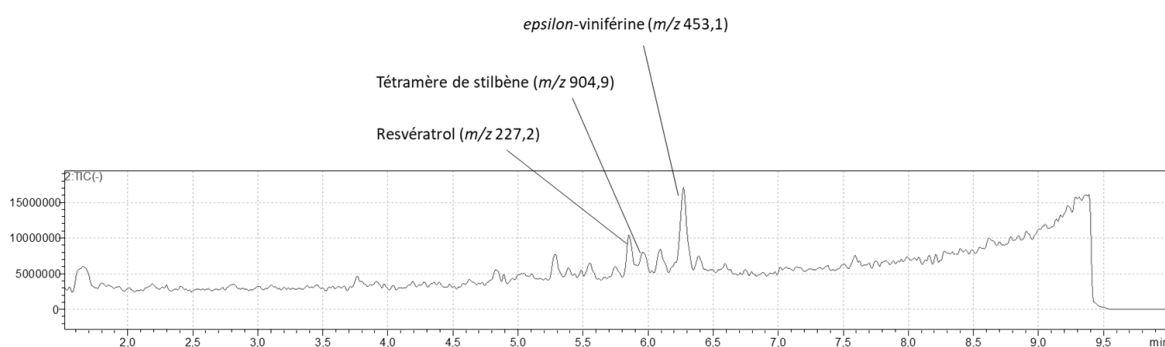


Figure 31: chromatogramme d'un extrait de bois de vigne cv. 'Gewurztraminer' témoin obtenu en UHPLC-ESI-MS en mode négatif. TIC= Total Ion Current (somme des m/z détectés en unité arbitraire). Les m/z des pics annotés ont été corrélés avec la composition connue de l'extrait.

1.2. Influence des communautés microbiennes sur la présence et le comportement de Fmed

Dans les expériences réalisées précédemment, et afin d'observer le comportement propre de Fmed ou de Tver, aucune autre espèce fongique et bactérienne n'était présente dans les cultures. Or, dans une niche écologique donnée, les communautés microbiennes peuvent être riches et diverses et les interactions au sein de ces communautés jouent un rôle important sur la croissance fongique et la dégradation du bois (Boddy, 2000; Johnston et al., 2016; Hiscox and Boddy, 2017). Entre espèces fongiques, ces interactions peuvent être antagonistes ou mutualistes en fonction des espèces fongiques. Des facteurs environnementaux, biotiques ou abiotiques, peuvent également favoriser ou défavoriser la croissance de certaines espèces (Hiscox and Boddy, 2017). Par exemple, certaines espèces fongiques modifient leur environnement (acidification, modification du potentiel osmotique, synthèse de métabolites spécialisés) ou leur morphologie (synthèse de pigments, épaissement du mycélium) afin de stopper physiquement ou chimiquement la croissance d'espèces antagonistes, de dégrader ou de métaboliser le mycélium de ces espèces (Boddy et al., 1985; Heilmann-Clausen and Boddy, 2005; Adomas et al., 2006; Ujor et al., 2012; Tudor et al., 2013). Du fait de ces caractères antagonistes, on peut distinguer des colonisateurs primaires, associés aux premiers stades de dégradation du bois, des colonisateurs secondaires. Les premiers sont souvent présents de façon latente dans le bois vivant et leurs activités de croissance et de dégradation du bois sont stimulées par les modifications physiologiques qui suivent la mort de la plante, tandis que les seconds sont généralement plus compétitifs et adaptés aux modifications physiologiques qu'a subi le bois pré-dégradé (Boddy, 2001; Moiseenko et al., 2019). D'après des analyses phylogénétiques menées sur des champignons de type pourriture blanche, l'apparition et l'expansion des gènes codant pour des LiPs est probablement liée à l'évolution des colonisateurs primaires (Moiseenko et al., 2019). De plus, la prévalence de peroxidases vis-à-vis des laccases a été observée pour un grand nombre de colonisateurs primaires (principalement de la famille des *Trametaceae*), alors que l'inverse est vrai pour des colonisateurs secondaires (tels que plusieurs espèces de la famille des *Steccherinaceae*, Polyporales). Selon cette hypothèse, les différences entre les sécrétomes de Fmed et de Tver observées sur sciure de vigne et de hêtre, ainsi que l'absence de LiPs observé dans le génome de Fmed (Floudas et al., 2012), suggèrent que Fmed soit considéré comme un colonisateur secondaire. D'autres caractéristiques des colonisateurs secondaires sont notamment une faible activité de dégradation de la cellulose, traduite par une plus faible sécrétion de CAZYmes

Discussion

spécifiquement impliquées dans la dégradation de la cellulose, une vitesse de croissance plus élevée, une capacité à mobiliser des nutriments et des mécanismes de dispersion adaptés (Boddy, 2000). D'après les taux de minéralisation du carbone observés dans le chapitre 1, et d'après les vitesses de croissance observées en milieux de culture solide tels que malt-agar et P25 (données non présentées), Fmed a une vitesse de croissance plus lente que Tver. Son mode de reproduction au vignoble le plus probable est la dispersion de spores (Moretti et al., 2021). Dans nos expérimentations (chapitres 1 et 2), une dégradation de type simultanée a été observée, et aucune différence entre les cellulases sécrétées par Fmed ou par Tver n'a pu être mise en évidence. Ces observations suggèrent que Fmed a un comportement intermédiaire entre colonisateur primaire et secondaire. En effet, il est fréquent que le comportement des champignons dégradeurs de bois ne corresponde pas strictement à l'une des stratégies décrites, mais que ces derniers possèdent des caractéristiques nuancées. Ces dernières peuvent également varier dans le temps pour un même individu, voire au sein même d'un individu (Boddy, 2001). Il est également possible que les conditions expérimentales choisies ne permettent pas d'observer certaines des spécificités de Fmed. Il serait intéressant par exemple d'étudier d'une part plus précisément les fonctions des CAZYmes identifiées dans le génome et dans le sécrétome de Fmed (cellulases ou hémicellulases notamment), ainsi que leurs activités enzymatiques sur différents substrats. Des analyses transcriptomiques permettraient également de compléter les résultats. D'autre part, il serait intéressant également d'observer ces différents traits pour Fmed en présence d'autres espèces fongiques.

Afin d'appréhender les qualités de compétiteur de Fmed envers d'autres espèces fongiques, des expériences préliminaires de co-cultures *in vitro* sur milieu solide ont été réalisées. Fmed a été mis en présence d'espèces connues de champignons dégradeurs de bois, de type pourriture brune (*G. trabeum* – Basidiomycota, Gloeophyllaceae, voir Figure 33a) ou blanche (*Pleurotus ostreatus* – Basidiomycota, Pleurotaceae, voir Figure 33b, et Tver, voir Figure 33c) ou d'espèces inconnues isolées à partir de bois de vigne mort, d'apparence saine ou nécrosée (Figure 34a-f, stage de M1 Renan Brunet, 2021). En présence de chacune des trois espèces de champignon dégradeur de bois, le mycélium de Fmed a eu une croissance identique à celle observée en l'absence d'autre champignon, plus lente que celle de chacune des trois autres espèces. Sa croissance a été soit stoppée au contact du mycélium de l'autre espèce (Tver et *G. trabeum*), soit le mycélium de l'autre espèce a recouvert celui de Fmed (*P. ostreatus*). Sur 18 co-cultures en présence de champignons inconnus isolés à partir de bois de vigne, plusieurs cas de figures ont été observés : (i) le mycélium de Fmed a été inhibé totalement (7cas/18, Figure

Discussion

34a), (ii) il a été stoppé à distance du mycélium du champignon antagoniste (4cas/18, Figure 34b), (iii) il a été recouvert par ce dernier (1cas/18, Figure 34c), (iv) le mycélium du champignon antagoniste n'a pas poussé (2 cas/18), (v) Fmed a été plus rapide et les croissances ont stoppé à la rencontre des deux mycéliums (2 cas/18, Figure 34d), (vi) les deux mycéliums se sont rencontrés et ont stoppé leur croissance (1 cas/18, Figure 34e), ou enfin (vii) le mycélium de Fmed recouvrait celui de l'espèce antagoniste, sans augmenter sa vitesse de croissance (1 cas/18, Figure 34f). Ces observations préliminaires suggèrent que Fmed soit relativement peu compétitif, mais que face à certaines espèces, il soit capable de prendre le dessus tout en conservant une croissance relativement lente.

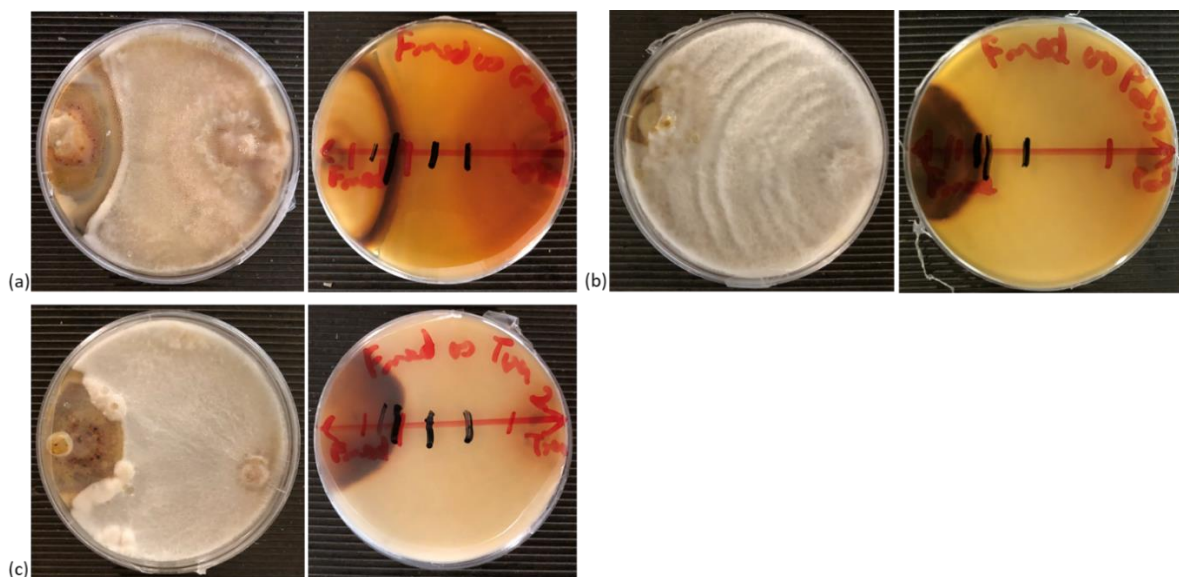


Figure 32: co-cultures de Fmed (gauche) face à (a) *Gloeophyllum trabeum*, (b) *Pleurotus ostreatus* ou (c) *Tver* après 14 jours de culture à 27°C sur malt-agar. (© Renan Brunet)

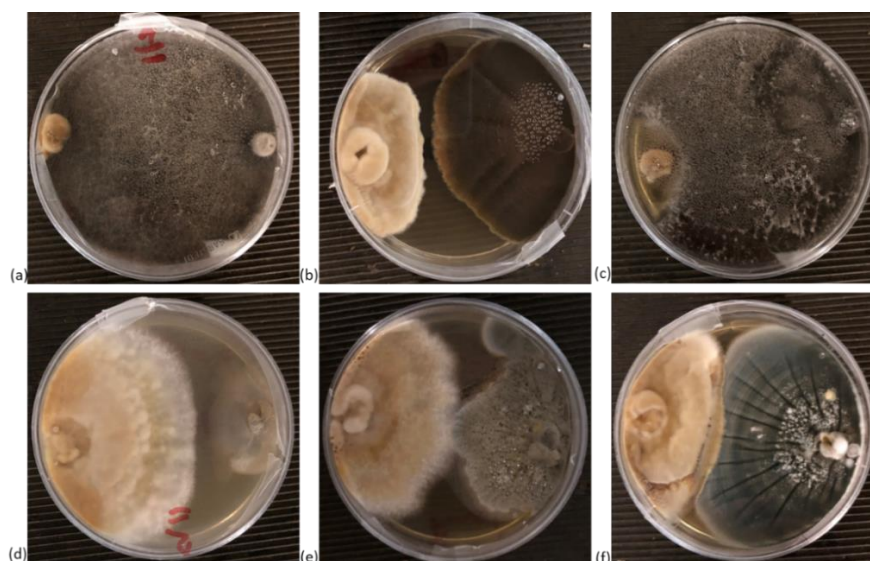


Figure 33: co-cultures de Fmed phco36 (à gauche) et d'endophytes non-identifiés (à droite) issus de bois morts de vigne de différents cépages (Gewurztraminer, Pinot noir, Riesling), d'apparence saine ou nécrosée, après 15 jours à 27 degrés sur malt-agar. (© Renan Brunet)

Discussion

Une autre manière d’appréhender les qualités de compétiteur ou de cohabitation de Fmed est d’étudier les communautés microbiennes du bois de vigne *in vivo*. Celles-ci y sont particulièrement diversifiées, et les rôles de chaque espèce et de leurs éventuelles interactions ne sont pas encore clairement établies (Bruez et al., 2014, 2020; Del Frari et al., 2019c). Dans le bois sain, l’espèce majoritaire identifiée sur des ceps de différentes origines (cv. ‘Cabernet-Sauvignon’, ceps âgés de 10 ans de la région de Bordeaux en France et de 19 ans d’un vignoble portugais, et cv. ‘Verdelho’ et ‘Shiraz’, ceps âgés de 18 à 20 ans de Nouvelle-Galles du Sud en Australie) est *P. chlamydospora* (11 à 60% des espèces fongiques dans les cordons et le tronc de bois de vigne cv. ‘Cabernet-Sauvignon’ et 59 à 89%), associé aux nécroses brunes typiques de l’Esca (Del Frari et al., 2019b; Bruez et al., 2020; Niem et al., 2020). Parmi les autres espèces identifiées figurent *Diplodia seriata*, *N. parvum* et *Cryptovalsa* sp. (*Ascomycota*, *Diatrypaceae*), des espèces à croissance rapide également associées aux MDB, et *P. minimum*, une espèce à croissance lente, également associée aux tissus nécrotiques bruns typiques de l’Esca (Luque et al., 2006; Bruez et al., 2020; Niem et al., 2020). Il est intéressant de noter ici que certains *Botryosphaeriaceae*, en particulier du genre *Neofusicoccum*, peuvent à la fois être présents en tant qu’endophytes dans différentes parties du bois de vigne sain, puis devenir pathogènes (Sakalidis et al., 2011). Ce comportement a également été suggéré pour *P. chlamydospora*, et l’un des facteurs déclencheurs de la pathogénicité peut être par exemple un stress hydrique (Edwards and Pascoe, 2004). Ce comportement correspond à une des caractéristiques des colonisateurs primaires tels que décrits précédemment (Moiseenko et al., 2019).

Dans le bois de deux cultivars considérés comme plus et moins sensibles aux MDB (respectivement ‘Alicante Bouschet’ et ‘Trincadeira’) issus d’une même parcelle au Portugal, la diversité fongique est plus importante au sein des ceps symptomatiques de MDB (plusieurs MDB confondues) que dans ceux asymptomatiques, et ce indépendamment du cultivar (Patanita et al., 2022). Les auteurs suggèrent donc que le génotype de la vigne n’explique pas ou ne suffit pas à expliquer les différences de résistance aux MDB observées, et que les communautés fongiques dépendent davantage des conditions environnementales et des pratiques culturales. Par ailleurs, la diversité génétique fongique intraspécifique ou les interactions au sein des communautés fongiques sont des exemples de facteurs biotiques qui peuvent jouer un rôle dans la colonisation fongique du bois de vigne et son impact sur la plante (Péros et al., 1999). Ces différents facteurs, et probablement leurs interactions, sont donc

Discussion

vraisemblablement décisifs dans l'établissement de la communauté fongique dans le bois de vigne.

Au sein de l'*amadou*, (où Fmed est principalement identifié), une faible diversité fongique est observée. Dans l'*amadou* de cordons de Cabernet-Sauvignon âgés de 10 ans par exemple, Fmed et *P. chlamydospora* sont les espèces majoritaires (Bruez et al., 2014). Ceci suggère soit une forte activité antagoniste de ces espèces vis-à-vis des autres espèces, soit que les conditions environnementales ont dans ce cas fortement favorisé ces espèces au détriment des autres espèces. Nos expériences préliminaires ont suggéré une faible compétitivité de Fmed face à d'autres champignons dégradeurs de bois ou face à des espèces inconnues. Cependant, face à certaines espèces (Figure 34f), il est capable de se développer au détriment de l'autre espèce. Ceci a également déjà été observé pour Fmed *in vitro* face à *P. chlamydospora* (Sparapano et al., 2000). Les auteurs ont également montré que les croissances de Fmed et de *P. minimum* (= *P. aleophilum*) sont stoppées à leur rencontre mais sans recouvrement de l'une ou l'autre espèce. En revanche, Fmed forme alors un mycélium plus épais et brun en périphérie, et des hyphes aériens à la frontière avec *P. minimum*. Ces modifications morphologiques et l'arrêt de la croissance de Fmed ne sont plus observés lorsque les trois espèces sont en co-culture, suggérant un effet protecteur de Fmed par *P. chlamydospora* vis-à-vis de *P. minimum*. La nature des interactions entre ces espèces fongiques associées à l'Esca, et probablement avec d'autres espèces présentes dans le bois de vigne, semble donc être particulièrement complexe et impliquer des interactions multi-espèces. A l'inverse, certaines espèces ralentissent (Figure 30b), inhibent totalement (Figure 34a) ou recouvrent (Figure 34c) le mycélium de Fmed. L'inhibition de la croissance de Fmed (de 24,2 à 71,8 %) *in vitro* a également été observée lors de co-cultures avec différentes souches des espèces *Epicoccum mezzettii* et *E. layuense* (Ascomycota, Didymellaceae), présentes dans le bois de vigne et potentiel agent de biocontrôle de l'Esca (Del Frari et al., 2019a). Face à *E. layuense*, les hyphes de Fmed forment des agrégats à l'approche des hyphes de l'antagoniste. La dégradation (plasmolyse) d'hyphes et la formation d'anses d'anastomoses sont également observées. D'autres espèces endophytes du bois de vigne, telles que *Trichoderma* sp (Ascomycota, Hypocreaceae) et *Clonostachus rosea* (Ascomycota, Bionectriaceae), sont connues pour leurs activités inhibitrices *in vitro* et *in vivo* envers des espèces fongiques associées aux MDB (Di Marco et al., 2004; John et al., 2005; Silva-Valderrama et al., 2021), mais pas envers Fmed. Afin de mieux comprendre la nature des interactions entre Fmed et d'autres espèces fongiques présentes dans le bois de vigne, il serait intéressant de compléter les expériences décrites par des co-cultures de Fmed avec d'autres

Discussion

espèces et différentes combinaisons d'espèces. Il serait également intéressant d'étudier l'effet d'autres facteurs sur ces interactions, par exemple en réalisant ces co-cultures sur du bois et sous différentes conditions environnementales, et d'étudier plus précisément les mécanismes mis en place par des analyses métabolomiques ou protéomiques par exemple.

Les champignons dégradateurs de bois peuvent également interagir avec les communautés bactériennes présentes dans le bois (Johnston et al., 2016). Ces interactions peuvent être antagonistes (inhibition de la croissance fongique par les bactéries et inversement, par production de composés antimicrobiens, par modification du milieu, ou par compétition pour les nutriments par exemple) ou mutualistes (consommation de produits de dégradation, transformation de nutriments en une forme assimilable, ...). Elles peuvent également jouer un rôle sur la dégradation du bois. En effet, la composition de la communauté fongique est un facteur décisif influençant la communauté bactérienne dans le bois (Johnston et al., 2019). Cette influence pourrait être expliquée au moins en partie par la modification du pH (acidification) induite par les champignons dégradateurs de bois. Il est intéressant de noter également que si la présence d'espèces fongiques fluctue au cours de l'année, celle-ci exerce une influence sur la communauté bactérienne avant tout au moment où elle est présente, et non pas (ou moins) *a posteriori* (ce qui serait le cas si cette influence était principalement due à une modification du substrat) (Johnston et al., 2019). Parmi les bactéries identifiées dans le bois de forêt, on trouve majoritairement des *Proteobacteria* (dont les *Burkholderiaceae*, connues pour leur affinité avec certains champignons (Johnston et al., 2016)), des *Acidobacteria*, mais également des Firmicutes (*Terrabacteria*), et des Bacteroidetes. Parmi cette dernière catégorie des *Chitinophagaceae* ont été identifiées, et pourraient être impliquées par exemple dans la dégradation des paroi cellulaires fongiques, riche en chitine. Les *Actinobacteria* (*Terrabacteria*) peuvent également être très représentées mais ont une préférence pour les pH plus élevés.

La communauté bactérienne est elle aussi très diversifiée dans le bois de vigne sain, où *Pantoea* et *Enterobacter* (*Proteobacteria*, *Enterobacteriaceae*), *Bacillus* (Firmicutes, *Bacillaceae*), *Paenibacillus* (Firmicutes, *Paenibacillaceae*) et *Stenotrophomonas* (*Proteobacteria*, *Xanthomonadaceae*) sont parmi les genres majoritaires dans des ceps de vigne cv. 'Cabernet-Sauvignon' âgés de 10 ans prélevés en région bordelaise (Bruez et al., 2015, 2020). Au sein de vignobles australiens, les genres majoritaires observés sont *Pseudomonas* (*Proteobacteria*, *Pseudomonadaceae*), *Roseococcus* (*Proteobacteria*, *Acetobacteraceae*) et de la famille des *Chitinophagaceae* (Bacteroidetes, *Sphingobacteria*) (Niem et al., 2020). Ces populations

Discussion

dépendent de plusieurs facteurs, tels que les conditions environnementales, les pratiques culturales, le génotype, l'organe, la localisation dans le cep (profondeur, hauteur) ou encore son âge. Par exemple, dans le bois de ceps de vigne cv. 'Sauvignon blanc' âgés de 21 ans et symptomatiques de l'Esca en région bordelaise, une plus grande diversité et des genres majoritaires différents ont été observés dans le bois sain du tronc (*Luteimonas* – *Proteobacteria*, *Xanthomonadaceae* – et *Olivibacter* – *Bacteroidetes*, *Sphingobacteria*, *Sphingobacteriaceae*) que dans celui des cordons (*Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* et *Bacillus* majoritairement) (Haidar et al., 2021).

Au sein de l'*amadou*, la communauté bactérienne est, elle aussi (tout comme la communauté fongique), moins diversifiée (Bruez et al., 2014). Les genres bactériens majoritaires dans l'*amadou* de cordons de vigne cv. 'Cabernet-Sauvignon' âgés de 10 ans sont les genres *Sphingomonas* (*Bacteroidetes*, *Sphingobacteria*, *Sphingobacteriaceae*) et *Mycobacterium* (*Terrabacteria*, *Actinobacteria*, *Mycobacteriaceae*), tandis que dans des ceps de vigne cv. 'Sauvignon blanc' âgés de 21 ans, les genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pseudoxanthomonas*, *Olivibacter* et *Stenotrophomonas* sont majoritaires dans l'*amadou* des cordons, et les genres *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter* (*Proteobacteria*, *Alcaligenaceae*), *Olivibacter* et *Pseudomonas* sont majoritaires dans l'*amadou* du tronc (Haidar et al., 2021). Il est intéressant de noter que des bactéries des genres identifiés dans l'*amadou* ou dans le bois de vigne sain, notamment des genres *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus* ou *Enterobacter* sont capables de dégrader les composants structuraux du bois dont la lignine (Bandounas et al., 2011; Tian et al., 2014). La possibilité d'une activité synergique entre les bactéries présentes dans le bois de vigne et Fmed a de plus été démontrée *in vitro* (Haidar et al., 2021).

Parmi les espèces fongiques et bactériennes identifiées dans le bois de vigne, des activités antagonistes ont été montrées entre des isolats bactériens du genre *Pseudomonas*, endophytes de bois de vigne, et plusieurs espèces fongiques associées aux MDB (Niem et al., 2020). En effet, au moins neuf de ces isolats inhibent de 8,5 à 70,4 % (selon l'isolat et l'espèce fongique) la croissance mycélienne *in vitro* de neuf espèces fongiques associées aux MDB (*Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia mutila*, *D. seriata*, *Dothiorella vidmader*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum australe*, *N. luteum*, *N. parvum* et *Spencermartinsia viticola*). Une activité inhibitrice de la production de spores de *P. chlamydospora* et *P. minimum* a également été observée pour trois isolats. L'inhibition de la croissance fongique parfois sans contact direct entre le mycélium et la zone de croissance bactérienne suggère que les isolats de *Pseudomonas*

sont capables de sécréter des molécules aux propriétés antifongiques. De tels mécanismes ont en effet été décrits pour certaines espèces de *Pseudomonas*, capables de produire des molécules aux propriétés antifongiques, telles que le 2,4-diacétylphloroglucinol, l'acide 1-carboxylique phenazine et ses dérivés, les sidérophores pyolutéorine et pyrrolnitrine, ou encore de montrer une activité exoprotéase (Niem et al., 2020).

2. Importance des facteurs abiotiques pour l'adaptation de Fmed

2.1. Importance des teneurs en éléments nutritifs

La concentration et la biodisponibilité des éléments nutritifs indispensables à la croissance des champignons (azote, potassium, ...) peuvent exercer un rôle important sur la croissance et l'activité de dégradation du bois des champignons (Blanchette, 1991; ten Have and Teunissen, 2001). Dans les expériences réalisées (chapitres 1 et 2), ces éléments ont été ajoutés en quantités non limitantes afin de favoriser la croissance du champignon. Des mécanismes fongiques en réponse à une faible teneur en certains nutriments ont donc pu ne pas être observés. Dans la vigne par exemple, de plus faibles disponibilités en azote, potassium et magnésium ont été corrélées à davantage de symptômes foliaires de l'Esca (Calzarano et al., 2009). Ceci pourrait être expliqué soit par le fait que les champignons associés à l'Esca, par leur présence dans les vaisseaux de la plante, empêchent le transport des nutriments nécessaires à la photosynthèse, soit par le fait qu'ils utilisent des nutriments et glucides disponibles au détriment de la plante.

Les besoins en certains nutriments sont liés au mode de vie et au génotype des champignons dégradeurs de bois. Par exemple, parmi plusieurs espèces de basidiomycètes se développant sur du bois de chêne, les parasites accumulent dans leurs sporophores davantage de potassium (1,3 fois plus environ) et moins de calcium (5,5 fois moins environ) que les saprophytes, suggérant des mécanismes spécifiques d'assimilation liés à leur mode de vie (Campos, 2011).

D'autre part, les concentrations en certains nutriments peuvent induire ou réprimer le niveau d'expression d'enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine, notamment les laccases, les LiPs et les MnPs (ten Have and Teunissen, 2001). En tant que co-facteur des MnPs, le manganèse est un élément clé pour le fonctionnement de ces enzymes, majoritaires parmi les peroxydases de Fmed. Sa présence est également nécessaire à l'expression de certains gènes codant pour des MnPs chez *P. chrysosporium* et *Dichomitus squalens* (*Basidiomycota*, *Polyporaceae*), bien que cet effet ne soit pas observé sur toutes les isozymes (Brown et al., 1991; Périé and Gold, 1991). Au contraire, l'addition d'ion manganèse (Mn^{2+}) dans des cultures

Discussion

de *Pleurotus* sp. (*Basidiomycota*, *Pleurotaceae*) inhibe la production de MnPs (Martinez et al., 1996). L'effet de la teneur en Mn^{2+} dépend donc probablement de différents facteurs. Cet élément a également un rôle indirect sur l'activité des LiPs, car il est capable d'inhiber la production fongique endogène d'alcool veratryl, un médiateur de l'activité des LiPs (Koduri and Tien, 1995; Mester et al., 1995). Le Mn^{2+} agit également en tant que réducteur de stress oxydatif par la réduction de radicaux libres et par l'induction d'une enzyme antioxydante, la manganèse-superoxyde dismutase (ten Have and Teunissen, 2001). L'activité ligninolytique est également favorisée par un milieu carencé en glucides ou en soufre, et est sensible à la balance entre les concentrations en éléments traces, en particulier en éléments Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} et Mo^{6+} (Jeffries et al., 1981). Le centre catalytique des laccases contient quatre atomes de cuivre, qui est donc également un élément clé pour l'activité ligninolytique des pourritures blanches. Sa présence induit non seulement une plus forte activité laccase mais également la transcription de gènes codant pour des laccases (Levin et al., 2008; Mäkelä et al., 2013; Vrsanska et al., 2016). Enfin, l'azote et le fer font partie des éléments jouant également un rôle particulièrement important dans le comportement des pourritures blanches, et font l'objet d'une attention particulière dans les paragraphes suivants.

2.1.1. Effet de la teneur en azote

La disponibilité et la concentration en azote exercent une influence importante sur la croissance et les activités de dégradation des champignons dégradateurs de bois (Mikiashvili et al., 2005; Elisashvili et al., 2008). Par exemple, une faible concentration en azote peut favoriser une dégradation dite sélective, c'est-à-dire que la lignine soit dégradée avant les autres polymères structuraux du bois, les polysaccharides (Eriksson et al., 1990). Dans le bois, l'azote est présent en relativement faible quantité par rapport à d'autres éléments nutritifs tels que le carbone. Ces teneurs sont généralement comprises entre 0,01 et 0,3 mg/100mL (% m/v) dans des bois de feuillus (Tarasov et al., 2018), ou entre 0,03 et 0,1% m/m ms dans le bois en général (Mazheika et al., 2020). Dans le bois de vigne, des valeurs supérieures, de 0,6 à 0,7 % m/v, ont été rapportées (Agrelli et al., 2009). Des analyses élémentaires réalisées avec les sciures de bois utilisées dans nos expérimentations, par Spectrométrie de Masse à Plasma à Couplage Inductif (ICP-MS), au sein de la plateforme SilvaTech à l'INRAE de Champenoux, ont confirmé une teneur en azote deux fois plus élevée dans le bois de vigne (0,32% m/m ms) que dans le bois de hêtre ou d'épicéa (0,16 et 0,15% m/m ms resp.) de nos échantillons. La teneur en azote dans le bois est également souvent référencée en termes de ratio carbone/azote (C/N), calculé à partir

Discussion

des pourcentages massiques de chacun de ces deux éléments. Les teneurs en carbone du bois varient selon l'espèce de bois et son état physiologique entre 43,4 et 56,0 % (Harmon et al., 2013). Des valeurs de ratios C/N rapportées pour 11 espèces d'arbres forestiers varient entre 237 et 1610 (Purahong et al., 2018).

Afin d'évaluer l'effet de la concentration en azote sur la morphologie et la croissance de *Fmed*, des expériences préliminaires ont été réalisées sur milieu synthétique (P25 modifié). Afin de modifier au minimum la teneur en carbone et donc de mieux maîtriser les différences de ratio C/N dans les milieux, le sulfate d'ammonium a été choisi en remplacement du tartrate d'ammonium dans le milieu P25 utilisé dans les chapitres précédents. Des réponses différentes à des variations de la concentration en azote et du rapport C/N dans le milieu, en termes de vitesses de croissance et de morphologies, ont été observées pour *Fmed* (Figure 35) et *Tver* (Figure 36) en fonction de la concentration en azote. En absence d'azote et à des faibles concentrations en azote (jusqu'à 0,20 mM pour *Fmed* et 0,75 mM pour *Tver*) et des ratios C/N plus faibles (respectivement inférieurs à 1649 et 436), les mycéliums de *Fmed* et de *Tver* sont visuellement plus fins. La vitesse de croissance de *Fmed* ($2,8^{+/-0,36}$ mm/jour en moyenne) n'est pas corrélée aux variations de la concentration, contrairement à celle de *Tver* qui est plus élevée en l'absence d'azote ($4,5^{+/-0,17}$ mm/jour), et diminue avec l'augmentation de la concentration (jusqu'à $1,6^{+/-0,14}$ mm/jour à 3,9 mM et C/N 84).

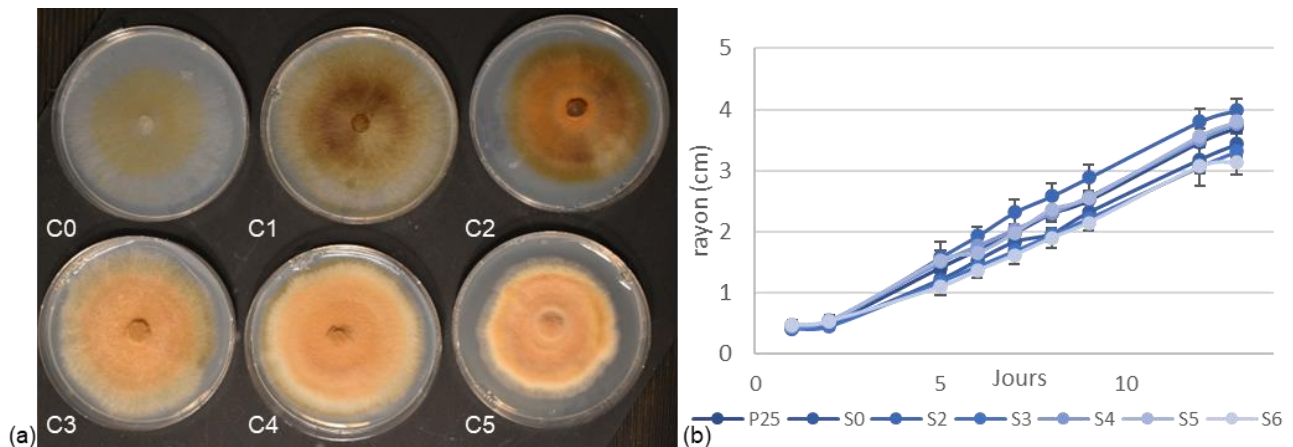


Figure 34: (a) morphologie après 14 jours et (b) suivi de la croissance du mycélium de *Fmed* en cours de culture à 27°C sur P25 modifié à différentes concentrations en azote: C0 (0M), C1 (0,11 mM, C/N 2859), C2 (0,20 mM, C/N 1649), C3 (0,41 mM, C/N 802), C4 (0,75 mM, C/N 436) et C5 (3,9 mM, C/N 84). (© Marion Schilling)

Discussion

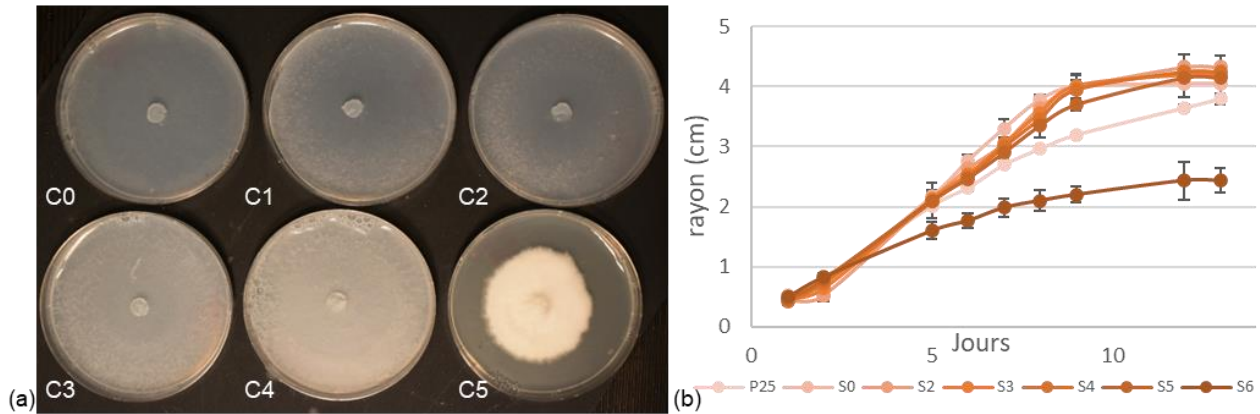


Figure 35: (a) morphologie après 14 jours et (b) suivi de la croissance du mycélium de Tver en cours de culture à 27°C sur P25 modifié à différentes concentrations en azote : C0 (0M), C1 (0,11 mM, C/N 2859), C2 (0,20 mM, C/N 1649), C3 (0,41 mM, C/N 802), C4 (0,75 mM, C/N 436) et C5 (3,9 mM, C/N 84). Les points au-delà de 4cm de rayon (jours 13 et 14 des concentrations S0 à S5) ont atteint les limites de la boîte de culture et n'ont pas été pris en compte dans le calcul de la vitesse de croissance. (© Marion Schilling)

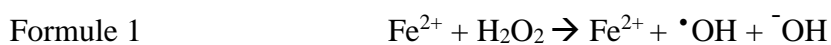
Tous les champignons filamenteux ne sont pas capables de croître sur un milieu pauvre en azote. Ce comportement est caractéristique d'une adaptation à un milieu pauvre en azote, tel que le bois (Mazheika et al., 2020). La formation d'hyphes très fins par les champignons dégradateurs de bois leur permet de pénétrer en profondeur dans le bois, d'y sécréter des enzymes hydrolytiques pour le dégrader de façon efficace, et d'acheminer plus rapidement des nutriments qui resteraient sinon inaccessibles. Les morphologies observées pour Tver et Fmed à de faibles concentrations en azote témoignent donc de leur adaptation en tant que dégradateurs de bois. Une telle morphologie a également été associée à des mitochondries « super-allongées », permettant également de mieux acheminer les nutriments le long de l'hyphe (Mazheika et al., 2020). Par ailleurs, pour certaines espèces de pourritures blanches, telles que *Phanerochaete chrysosporium* (*Basidiomycota*, *Phanerochaetaceae*), l'activité ligninolytique est stimulée par une faible teneur en azote du milieu (Jeffries et al., 1981; Kaal et al., 1993). Ces observations soulignent également que l'ajout d'une quantité non limitante d'azote dans les cultures (chapitres 1 et 2) a pu modifier le comportement de Fmed et de Tver. Il serait donc intéressant de renouveler les expériences réalisées sans apporter d'autre source d'azote que celle contenue dans le bois, et ce d'autant plus que la forte teneur en azote dans le bois de vigne, relativement aux bois de forêt en général, est une spécificité de ce substrat. De telles expériences, en comparaison avec celles réalisées, permettraient donc d'étudier le rôle du métabolisme de l'azote sur l'adaptation de Fmed au bois de vigne.

La forme chimique de la source d'azote exerce elle aussi une influence importante sur le comportement des champignons dégradateurs de bois (Mikiashvili et al., 2005; Elisashvili et al., 2008). L'azote sous forme d'érythromycine (C₃₇H₆₇NO₁₃) ou d'ampicilline (C₁₆H₁₈N₃NaO₄S)

à 10 ou 50 mg/L ou de nitrate (NO_3^-) est assimilable par différentes espèces de pourritures blanches (*Fomes fomentarius*, *Stereum hirsutum*, *Trametes ochracea*, *Coprinus comatus*, *Pleurotus ostreatus* et *Agaricus bisporus*) (Mazheika et al., 2020). Dans le bois de vigne, l'azote peut être présent en tant que réserve sous forme d'acides aminés tels que l'arginine par exemple (Zapata et al., 2004). La capacité à assimiler différentes formes d'azote serait donc également un trait intéressant à considérer dans l'étude de l'adaptation de Fmed à son substrat.

2.1.2. Rôle du Fer

Un autre élément particulièrement important pour les champignons dégradeurs de bois, bien que présent à l'état de traces dans le bois, est le fer (Sebestyen et al., 2022). En effet, l'action de chélateurs de fer (sous forme d'ion ferrique Fe^{3+}), synthétiques ou produits par des micro-organismes antagonistes tels que des espèces des genres *Trichoderma* (*Ascomycota*, *Hypocreaceae*) et *Bacillus*, inhibe la croissance des ascomycètes *E. lata*, *P. chlamydospora* et *P. minimum*, tout en rendant le fer plus accessible à la plante et stimulant la croissance de cette dernière (Canessa et al., 2012). L'importance de la présence et de la biodisponibilité du fer dans le substrat de Fmed a été encore peu étudiée. Cependant, comme cela a été montré pour *P. chrysosporium*, le fer est un élément essentiel à la croissance des pourritures blanches. Il joue en effet un rôle dans le métabolisme central des champignons, et est un cofacteur important d'enzymes fongiques, en particulier des MnPs et des LiPs, des peroxydases à hème. De plus, bien que ces mécanismes soient prépondérants pour le développement des pourritures brunes, les réactions dites de Fenton (ou CMF, pour Chelator-Mediated Fenton reactions) jouent également un rôle dans la dégradation du bois par les pourritures blanches (Arantes et al., 2011). Ces réactions font partie d'un mécanisme complexe impliquant la réduction de Fe^{3+} présent dans le bois en fer ferreux (Fe^{2+}), sous l'action de molécules à faible poids moléculaires (LMW, pour Low-Molecular Weight compounds). En présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) est ensuite produit selon la Formule 1. Le radical hydroxyle est une espèce réactive de l'oxygène (ROS) au pouvoir oxydatif particulièrement fort, capable de dépolymériser des polysaccharides (cellulose, hémicelluloses en particulier) et d'attaquer partiellement la lignine (par déméthylation ou déméthoxylation notamment).



Les CMF jouent probablement un rôle clé pour certaines pourritures blanches, en particulier celles qui ne possèdent pas de LiPs, mais seulement des MnPs et des laccases, telles que Fmed.

Discussion

En effet, les LiPs sont les seules oxydoréductases fongiques capables de cliver la partie non-aromatique de la lignine. Or les CMF sont capables de compléter l'action des MnPs et des laccases, dont les substrats sont uniquement aromatiques, pour dégrader entièrement la lignine (Arantes and Milagres, 2007). La dégradation des parties non-aromatiques de la lignine a en effet été possible sous l'action de MnPs et de laccases après ajout de LMW, de Fe^{3+} et de H_2O_2 afin de provoquer des CMF, suggérant une action synergique de ces mécanismes non-enzymatiques et enzymatiques. Les mécanismes exacts de cette synergie ne sont pas encore totalement élucidés. Ils pourraient être expliqués par une oxydation des parties non-aromatiques, qui conduirait à la formation de cycles aromatiques, substrats des MnPs et des laccases. Ces mécanismes ne sont raisonnablement pas envisageables pour toutes les espèces de pourritures blanches, mais il serait intéressant d'étudier plus en détails la production de LMW, leurs effets et les éventuelles CMF provoquées et utilisées par Fmed dans le bois. Il serait intéressant d'étudier également la teneur en fer dans le bois de vigne dans différentes conditions, afin de déterminer si un tel mécanisme pourrait être un facteur d'adaptation de Fmed à son substrat. Il est intéressant de noter que différents métaux, en particulier le cuivre, peuvent également être impliqués à la place du fer dans les CMF (Arantes and Milagres, 2007). Par ailleurs, ces réactions nécessitent la présence d'oxygène et ont lieu en pH acide (3 à 5,5) (Goodell et al., 2020). Des investigations plus détaillées du rôle des CMF sur l'adaptation de Fmed devront donc prendre en compte ces facteurs (voir paragraphes 2.3 et 2.5 de la discussion). De plus, il est possible que d'autres facteurs biotiques ou abiotiques (communautés microbiennes, taux d'humidité, ...) jouent un rôle également sur l'importance des CMF. Une étude récente a en effet proposé que des activités de type CMF ont lieu de façon synergique entre *E. lata*, *P. chlamydospora* et *P. minimum*, trois espèces impliquées dans les MDB (Perez-Gonzalez et al., 2022). Les auteurs suggèrent par exemple que certaines espèces puissent conduire davantage à la production de H_2O_2 et d'autres davantage à la réduction du fer ferrique. Cette activité synergique est également une piste d'investigation afin de comprendre la colonisation du bois de vigne par Fmed, qui pourrait profiter des CMF produites par *P. chlamydospora* et/ou *P. minimum* afin de dégrader totalement les constituants du bois de vigne.

2.2. Effet de la température

La croissance des champignons dégradeurs de bois est généralement optimale entre 24 et 32°C, et cet optimum dépend notamment de l'espèce fongique mais aussi des autres conditions environnementales, telles que le pH ou l'activité de l'eau (Schubert et al., 2010; Goodell et al., 2020; Negrão et al., 2021). Sauf dans le cas particulier de champignons thermophiles, la

Discussion

croissance fongique est rendue difficile au-delà de 39 à 40°C, et des températures supérieures à 56°C peuvent avoir des conséquences irréversibles telles que la dénaturation de protéines ou de l'ADN (Goodell et al., 2020). Par exemple, à 3°C ou à 40°C, les croissances mycéliennes de *P. ostreatus* (pourriture blanche) et de Tver sont totalement inhibées (Šnajdr and Baldrian, 2007). La température optimale de croissance de Fmed, déterminée pour 18 souches mises en culture entre 5 et 35°C sur malt-agar avec extrait de levure (2-2-0,05%), est de 30°C (Fischer, 2002). Des expériences préliminaires de suivi de la croissance de Fmed phco36 à 18, 25 et 30°C sur trois milieux de culture différents (le milieu pauvre Tien and Kirk (Kirk et al., 1986), le milieu riche malt-agar (2-3%), et le milieu synthétique riche P25) ont confirmé cette valeur (données non présentées). Les vitesses de croissance moyennes sur ces trois milieux étaient respectivement de $0,986^{+/-0,082}$, $1,62^{+/-0,207}$ et $2,08^{+/-0,342}$ mm/jour, ce qui est proche des vitesses de croissance observées par Fischer (2002). Ces dernières sont de 3 à 4,5 cm en 2 semaines (soit environ 2,1 et 3,2 mm/jour). La température optimale de croissance de Tver, déterminée au laboratoire (données non présentées), est de 25°C. La température de culture appliquée (chapitres 1 et 2) a donc été choisie de façon à être située entre les températures optimales de chacune des deux espèces utilisées, Fmed et Tver. Cependant, le choix de ce paramètre a pu exercer une influence sur le comportement des champignons étudiés.

La température influence également la production et l'activité des enzymes ligninolytiques (Šnajdr and Baldrian, 2007). Les températures optimales de production de laccases et de MnPs par Tver sont toutes deux de 35°C alors qu'elles sont par exemple de 30°C pour *P. ostreatus*. La température optimale d'activité de laccases purifiées varie généralement entre 50 et 70°C, plus rarement de 25 à 80°C, en fonction de l'espèce fongique dont elles sont originaires. Elle est de 55°C pour les laccases de Tver, et de 40 ou 50°C pour une laccase de Fmed, en fonction de son substrat (Šnajdr and Baldrian, 2007; Abou-Mansour et al., 2009). Cet optimum est généralement plus faible pour les MnPs (entre 25 et 60°), et est d'au moins 60°C (températures plus élevées non testées) pour des MnPs purifiées de Tver (Šnajdr and Baldrian, 2007). Le choix de la température lors des expérimentations précédentes a donc pu exercer une influence sur la production et les activités des enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine et la détoxification.

Au vignoble, des températures plus douces en été ont été associées à davantage de symptômes foliaires de l'Esca, dans des vignobles où la somme des degrés jour de croissance (voir Encart 1) entre avril et août variait d'une année à l'autre de 1475°C à 1919°C (soit des températures quotidiennes médianes moyennes de 18,1 à 20,5°C) et en juillet (mois au cours duquel les

Discussion

températures ont été anti-corrélées avec les symptômes d'Esca) de 386 à 503°C (soit de 22,5 à 26,2°C) (Calzarano et al., 2018). De plus, une précédente étude suggère qu'un été plus frais (entre 18,6 et 24,5°C en moyennes quotidiennes entre juin et août) et plus humide est corrélé à davantage de symptômes foliaires, tandis qu'un été plus chaud et sec (entre 19,7 et 26,8°C entre juin et août) entraîne davantage de cas d'apoplexie (Surico et al., 2000). Cela pourrait s'expliquer d'une part par le fait que la température soit un facteur de stress abiotique pour la vigne, déjà fragilisée par la présence des champignons associés à l'Esca. D'autre part, celle-ci pourrait influencer les activités fongiques de croissance ou de dégradation du bois. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse en étudiant l'effet de la température, à des valeurs rencontrées au vignoble, et éventuellement en synergie avec d'autres facteurs environnementaux (taux d'humidité notamment mais aussi pH), sur la croissance et les activités enzymatiques des champignons associés à l'Esca.

Encart 1 : Echelle de Winkler

La température quotidienne au vignoble peut être exprimée en « degrés jours de croissance », c'est-à-dire à partir de la médiane des températures de la journée (moyenne entre la température maximale et la température minimale), à laquelle est soustraite la température de base de la vigne, c'est-à-dire celle en-dessous de laquelle sa croissance est nulle. Cette dernière est de 10°C.

Ces degrés jours de croissance sont ensuite additionnés sur une période donnée afin de pouvoir comparer les températures de différents vignobles.

L'échelle de Winkler correspond à la somme des degrés jours d'une année sur la période du 1^{er} avril au 31 octobre.

Par ailleurs, les températures appliquées aux substrats (sciure et bûchettes) lors de leur séchage (48 heures à 105°C) et de leur stérilisation (20 minutes à 120°C) ont pu modifier ses propriétés, et donc leur durabilité (Goodell et al., 2020). L'application de hautes températures à certains bois, tels que le pin sylvestre (*Pinus sylvestris*), est en effet une méthode utilisée pour augmenter sa durabilité, notamment face à Tver (Militz and Altgen, 2014). Cependant, dans l'étude citée, les températures appliquées (180-220°C) étaient bien supérieures à celles de nos expériences. Les modifications de la durabilité du bois à la suite de tels traitements sont principalement liées à un effet sur sa capacité d'absorption de l'humidité, et dépendent de l'espèce de bois considéré. Sur certaines espèces seulement, dès 100°C, un faible effet est observé après séchage. C'est le cas pour les espèces *Pseudotsuga menziesii*, *Laurelia sempervirens*, *Castanea sativa*, mais pas

pour *Quercus robur* ou *Pinus radiata* par exemple (Popper et al., 2005). Par ailleurs, à des températures entre 100 et 160°C, un déplacement de lipides et de cires est observé le long des cellules radiales parenchymateuses vers l'extérieur de l'aubier dans le bois de *P. sylvestris* (Nuopponen et al., 2003). Les traitements à haute température peuvent donc avoir modifié les propriétés physico-chimiques des substrats utilisés ainsi que leurs teneurs ou la localisation, et donc l'accessibilité, des extractibles. Si l'on souhaite reproduire les expériences réalisées en étant au plus proche des conditions réelles rencontrées au vignoble et en forêt, il serait intéressant de vérifier l'impact des prétraitements appliqués aux bois étudiés par des analyses complémentaires. Eventuellement, d'autres méthodes de stérilisation pourraient être envisagées, ou le séchage pourrait être évité ou réalisé à basse température.

2.3. Effet du pH

Le pH du milieu exerce une influence sur la croissance et sur l'activité des champignons dégradateurs de bois (Tudor et al., 2013). Ce facteur peut être plus ou moins important, par rapport à d'autres facteurs (température, activité de l'eau), en fonction de l'espèce fongique (Schubert et al., 2010). La perte de masse de bois de hêtre en présence de Tver est inférieure lorsque le pH augmente (artificiellement, de 4,3 à 5) (Tudor et al., 2013). Les auteurs proposent différents mécanismes pour expliquer cet effet : une modification de la capacité à assimiler les nutriments à travers la membrane cellulaire fongique, une légère modification du pH cytoplasmique fongique, ou la modification de la biodisponibilité de certains nutriments du fait de réorganisations acido-basiques dans le bois. Dans les expériences réalisées, le pH initial du milieu liquide ajouté à la sciure de bois était de 4,8 (mesuré avant autoclave et ajout de thiamine et du mélange Kanieltra) et celui du milieu MA utilisé pour la dégradation des bûchettes était de 5,5 (mesuré avant autoclave). Cependant, le pH de la sciure et des bûchettes de bois a pu influencer le comportement de Fmed et de Tver. Ce dernier n'a pas été mesuré pour les expérimentations, mais dans la littérature, des valeurs de pH pour le bois de hêtre de 4,4, et pour les bois de chêne et d'épicéa de 5,0 ont été rapportés (Purahong et al., 2018). Des valeurs de 4,2 à 6,0 ont été mesurées pour respectivement du bois de frêne ou de pin Douglas (Purahong et al., 2018). Le pH du bois peut également varier en fonction de la saison, et des valeurs de pH de bois de vigne (rameaux du cultivar Cape Riesling) de 4,82 en novembre à 6,46 entre mai et juin ont été rapportées (Ferreira, 1999).

D'autre part, les champignons dégradateurs de bois sont capables de modifier le pH de leur substrat (Humar et al., 2001). Cette modification dépend, entre autres facteurs, du substrat et

des communautés microbiennes présentes : en 3 ans de dégradation microbienne en forêt, le pH de bois d'arbres forestiers reste stable, baisse ou augmente (Purahong et al., 2018). Par exemple, dans le cadre de l'étude de Purahong et al. (2018) il a baissé dans le cas du chêne (pH de 4,1 après une baisse de 0,9) et de l'épicéa (pH de 4,3 après une baisse de 0,7) et augmenté dans le cas du bois de hêtre (de 1,1, pH final de 5,5). La valeur la plus haute mesurée était de 7,2 pour du bois de peuplier (augmentation de 1,9). Les variations de pH lors de la dégradation microbienne du bois sont donc complexes, et la capacité d'un champignon à se développer à différentes valeurs de pH peut être un facteur d'adaptation. Il serait donc intéressant d'étudier la tolérance et le comportement de *Fmed* en réponse à des variations de pH de son substrat, et d'étudier plus en détail les variations de pH du bois de vigne symptomatique de l'Esca à différents stades de la maladie et de colonisation par *Fmed*.

2.4. Effet du taux d'humidité

L'activité de l'eau (a_w) du bois, c'est-à-dire la teneur en eau du substrat par rapport à sa teneur saturante, peut favoriser ou non la croissance des champignons dégradeurs de bois. Cette dernière est optimale à de fortes a_w (proches de 1), et nécessite une valeur minimale d' a_w qui peut varier en fonction de l'espèce fongique ainsi que d'autres paramètres abiotiques, tels que la température. Un minimum de 30% de teneur en eau est généralement admis pour la croissance des champignons (Schubert et al., 2010; Goodell et al., 2020). Dans les expériences réalisées, le taux d'humidité à l'intérieur des fioles ou des boîtes de culture était identique d'une condition à l'autre et relativement élevé (saturation du substrat sous forme de sciure, ou utilisation de milieu de culture malt-agar riche en eau, avec formation de gouttelettes de condensation tout au long des deux types de cultures), afin d'être propice à la croissance fongique. Il peut cependant ne pas être représentatif des conditions réelles dans lesquelles se développe *Fmed*. Au vignoble, des précipitations plus importantes au printemps ou en été ont été corrélées à davantage d'expression des symptômes foliaires et à la présence d'*amadou* (3,3 à 4,4 % de la section) dans les coursons et sarments de l'année (Marchi et al., 2006; Guérin-Dubrana et al., 2013; Calzarano et al., 2018). Au contraire, les cas d'apoplexie sont eux plus difficiles à corréler aux conditions climatiques (Calzarano et al., 2018), et ont tendance à être davantage associés à un été chaud et sec (Surico et al., 2000). Le taux d'humidité et la température sont donc deux facteurs abiotiques qui interagissent et influencent de façon complexe la croissance de *Fmed* au vignoble et les symptômes de l'Esca. Par ailleurs, la teneur en eau d'un substrat est intimement liée à sa teneur en oxygène, puisque plus il est saturé en eau (forte a_w), moins il contient d'oxygène. La capacité des champignons dégradeurs de bois à

se développer sur des milieux particulièrement riches en eau, éventuellement pauvres en oxygène et à certaines températures peut donc être considérée comme un facteur d'adaptation (Schubert et al., 2010).

2.5. Effet de l'oxygène

Les champignons dégradateurs de bois sont des organismes au métabolisme aérobie, c'est-à-dire qu'ils ont besoin d'un minimum d'oxygène pour vivre (Goodell et al., 2020). C'est pourquoi dans nos expérimentations, l'air a été renouvelé régulièrement à pression atmosphérique (tous les 3 à 4 jours lors des mesures de respiration des cultures sur sciures, ou soit une fois par semaine soit continuellement lors des cultures en présence de bûchettes). Dans le bois, des teneurs variables, entre moins de 0,2 % et environ 16 % de dioxygène (O₂) (équivalent à entre 1 et 75% de la teneur en O₂ de l'air ambiant) ont été mesurées dans du bois vivant (tronc) de hêtre (Sorz and Hietz, 2008). Dans cette étude, ces teneurs variaient en fonction de la localisation dans le bois (bois de cœur ou aubier, et en fonction de la profondeur dans l'aubier : environ 13 % à 2 cm de profondeur puis environ 4 % à 5 et 15 cm de profondeur), du moment de la journée (de façon plus ou moins marquée selon la profondeur), ou de la saison (teneurs plus faibles à la fin de l'été et en automne). Les effets de ces facteurs n'ont cependant pas été observés sur d'autres bois tel que le bois de chêne, et sont donc à considérer avec précaution (Jensen, 1969). La teneur en oxygène dans le bois est donc variable et généralement inférieure à celle de l'atmosphère. Dans le bois mort, la teneur en oxygène dans le bois est plus importante que dans le bois vivant (parallèlement à une teneur en eau plus faible). Cette différence est déterminante pour la colonisation par les champignons saprotrophes, tels que *Tver* (Kazemi et al., 2001). La capacité des champignons dégradateurs de bois à se développer à certaines teneurs en O₂ pourrait donc être un facteur d'adaptation.

Les plaies de tailles auxquelles est régulièrement exposé le bois de vigne, sont considérées comme une porte d'entrée pour de nombreux micro-organismes dont *Fmed*. Elles sont une zone où la teneur en O₂ est plus élevée que dans les autres parties du bois (Sorz and Hietz, 2008). Il est intéressant de noter qu'une fois présent dans le bois de vigne, *Fmed* est généralement identifié au cœur du tronc ou des sarments. La présence et la localisation de *Fmed* dans le bois de vigne impliquent soit qu'il soit adapté à différentes teneurs en O₂ (inférieures à celles de l'air ambiant, et à la fois plus importantes au niveau des plaies de taille et plus faibles au cœur du bois qu'à la périphérie), soit qu'il ait besoin d'une forte teneur en O₂, et que celle-ci augmente dans le cœur du bois du fait de sa présence, favorisant ainsi sa propre croissance. Cette

Discussion

hypothèse serait cohérente avec des observations de teneur en O₂ plus élevée dans du bois de chêne dégradé (4 %) que dans du bois sain (2%) (Jensen, 1969). Afin d'explorer cette hypothèse, il serait intéressant de mesurer la teneur en O₂ du bois de vigne en fonction de la localisation dans le cep et de la présence de nécrose brunes ou d'amadou, ainsi que d'étudier le comportement de Fmed lorsqu'il est exposé à différentes teneurs en O₂.

Au cours des expérimentations présentées dans le chapitre 1, des différences de taux de minéralisation du carbone (en mgC/j) ont été observées selon que la mesure ait été effectuée après 3 ou 4 jours depuis le dernier renouvellement d'air (données non présentées). Les taux mesurés après 4 jours depuis le dernier renouvellement de l'air étaient plus faibles aussi bien dans les cultures de Fmed que de Tver. Ces observations suggèrent qu'un plus faible taux d'oxygène dans l'air (suite à la production de CO₂ par le champignon) ralentisse leurs activités métaboliques. La fréquence de renouvellement de l'oxygène et le taux d'oxygène introduit dans ces expérimentations ont donc pu influencer le comportement des deux espèces. Par ailleurs, le taux d'oxygène auquel les deux espèces ont été exposées n'est sans doute pas représentatif de celui observé dans leur environnement naturel. Afin d'étudier une éventuelle adaptation de Fmed à une teneur en O₂ particulière, d'autres expérimentations permettant de mieux contrôler le taux d'oxygène dans les cultures pourraient être envisagées. Dans les paragraphes suivants, les effets potentiels d'un excès ou d'un déficit en O₂ sont envisagés.

L'O₂ est utilisé par les champignons au cours de la chaîne respiratoire, au niveau des membranes mitochondriales, pour produire de l'énergie et est progressivement réduit en molécules d'eau (Li et al., 2011). L'oxygène présent dans le bois est également nécessaire aux cellules du bois vivantes, mais à des teneurs plus faibles que celles nécessaires au développement de la plupart des micro-organismes (Kazemi et al., 2001). Certains micro-organismes (des champignons lignivores présents dans le sol par exemple) sont capables d'adopter un métabolisme anaérobie ou quasi-anaérobie (Ran et al., 2016). Les champignons dégradeurs de bois quant à eux sont capables de se développer dans un milieu moins riche en O₂ que l'air, et leur comportement est influencé par la teneur en O₂ (Kazemi et al., 2001). Cette dernière peut par exemple influencer une adaptation morphologique : des hyphes aériens, tels qu'observés dans les cultures de Fmed, contribuent par exemple davantage à l'apport d'oxygène que le mycélium dans ou à la surface du substrat (Kuribayashi et al., 2022). En milieu aérobie, la croissance de ce type d'hyphes est rapide, au détriment de la vitesse de croissance des hyphes au sein du substrat. Le renouvellement de l'air en oxygène dans le cadre de nos expériences a

Discussion

donc pu favoriser ce type d'hyphes et limiter la croissance de Fmed au sein du substrat. De plus, ces différences morphologiques étant observées systématiquement entre Fmed et Tver, il est possible que Fmed ait développé cette morphologie en réponse aux conditions caractéristiques de sa niche écologique.

Lorsqu'il est présent en excès, l'O₂ peut s'avérer toxique dans les milieux intra- et extracellulaires, car il peut alors conduire à la formation de ROS (anion superoxyde O₂^{•-}, H₂O₂, HO[•]). Les ROS sont de puissants oxydants capables de causer des dommages parfois irréversibles tels que l'oxydation de l'ADN, de lipides membranaires ou de protéines, et sont produits en milieu intracellulaire comme extracellulaire (Li et al., 2009). On parle de stress oxydatif en cas de déséquilibre entre la production de ROS (trop importante) et les mécanismes antioxydants mis en place par l'organisme afin de limiter ces dommages. Paradoxalement, les ROS sont produits et utilisés par les champignons dégradeurs de bois, en particulier les pourritures brunes mais également les pourritures blanches dans une moindre mesure, dans le milieu extracellulaire, afin de dégrader les constituants du bois. Pourtant, ils peuvent avoir des effets toxiques pour l'hyphes et pour les enzymes extracellulaires fongiques, en particulier les CAZymes. Ces activités antagonistes sont en fait maîtrisées par une séparation spatiale et temporelle de la production de ROS et la dégradation enzymatique lors de la dégradation du bois (Castaño et al., 2018). Dans le cadre de nos expériences, l'apport régulier d'oxygène à une teneur supérieure à celles mesurées dans le bois, c'est-à-dire à laquelle ne sont pas habitués les champignons dégradeurs de bois, a pu générer un stress oxydatif. En réponse à ce stress, les champignons sont capables de synthétiser des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalases, peroxydases, glutathion peroxydases, peroxyredoxines), des molécules antioxydantes non-enzymatiques (glutathion, Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit ou NADPH, tréhalose, protéines de choc thermique), mais également de mettre en œuvre des mécanismes alternatifs tels que la chaîne respiratoire alternative (Figure 37) qui permet de limiter la quantité de ROS intracellulaire, ou la production de protéases destinées à dégrader les protéines oxydées et donc non-fonctionnelles (Li et al., 2009). Il serait intéressant de vérifier si un stress oxydatif a effectivement été subi par Fmed ou par Tver dans le cadre de nos expérimentations, afin d'éventuellement nuancer les résultats obtenus, et de discuter des mécanismes de réponse au stress que sont capables de mettre en place ces espèces.

Discussion

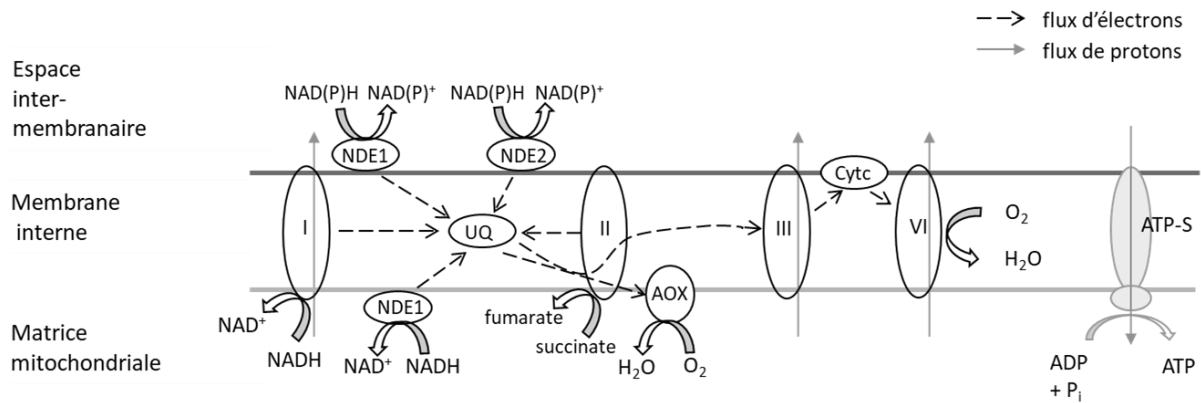


Figure 36: schéma de la chaîne respiratoire et de la chaîne respiratoire alternative des champignons filamenteux (adapté de Li et al., 2011). UQ : ubiquinone/ubiquinol, I : complexe I (NADH :ubiquinone oxydoréductase), II : complexe II (succinate :ubiquinone oxydoréductase), III : complexe III (ubiquinone :cytochrome c oxydase), IV : complexe IV (cytochrome c oxydase), NAD(P)H et NAD(P)⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Phosphate) formes réduite et oxydée, NDE1 : NAD(P)H déhydrogénase alternative externe 1, NDE2 : NAD(P)H déhydrogénase alternative externe 2. Cyt c : cytochrome c, ADP : Adénosine DiPhosphate, P_i : Phosphate inorganique, ATP : Adénosine TriPhosphate, ATP-S : ATP synthase. Les formes réduites NADH (ou Flavine Adénine Dinucléotide réduit FADH₂) et le succinate formés par la glycolyse et le cycle de Krebs, sont réoxydés en NAD⁺ (ou en Flavine Adénine Dinucléotide oxydé FAD⁺) par le complexe protéique I de la chaîne respiratoire, permettant le transfert d'électron à l'ubiquinone puis aux complexes III et IV pour finalement former deux molécules d'H₂O à partir d'une molécule d'O₂. Cette chaîne respiratoire entraîne le flux de protons au travers des complexes I, II et IV, et le gradient ainsi créé active la production d'ATP par l'ATP synthase. Chez la plupart des champignons (et des plantes), des mécanismes alternatifs existent, qui permettent le transfert de l'électron généré par l'oxydation des coenzymes directement à l'oxydase alternative (AOX), elle-même réduisant directement l'O₂ en H₂O sans générer de flux de protons. L'énergie créée par l'oxydation des coenzymes est perdue sous forme de chaleur. Ces mécanismes alternatifs sont une solution au stress oxydatif. Ils permettent de continuer à réduire l'O₂ dans les cas où certains des complexes de la chaîne respiratoire sont inhibés (I par la roténone et la piéricidine, III par l'antimycine, et IV par le cyanide) et sont induits par la présence de ROS (Li et al., 2009).

Une absence ou une trop faible teneur en oxygène peut également jouer un rôle sur le comportement des champignons dégradeurs de bois. Lorsque la teneur en oxygène diminue (de 10 à 1%), la quantité de mycélium de champignons dégradeurs de bois sur du bois diminue également (Kazemi et al., 2001). De plus, des teneurs en O₂ plus faibles que dans l'air (entre 1 et 10%) entraînent une plus faible perte de masse de bûchettes de bois de pin sylvestre ou de hêtre exposées à Tver. Cet effet de la teneur en O₂ est différent en fonction de la teneur en eau du substrat et en fonction de l'espèce de bois. La plus faible perte de masse pour les deux espèces de bois (pin ou hêtre) a été mesurée par Kazemi et al. (2001) à 5% d'O₂ et 80% d'humidité. La plus élevée a été mesurée à pression atmosphérique (environ 21% d'O₂) sur bois de pin sec ou de hêtre entre 30 et 80% d'humidité. Contrairement à Tver, la pourriture brune *Coniophorea puteana* (Basidiomycota, Coniophoraceae) n'a entraîné aucune perte de masse sur les bûchettes de pin à des teneurs en O₂ inférieures à celle de l'air et une plus faible perte de masse sur bûchettes de hêtre à une teneur de 10% d'O₂, quelle que soit la teneur en eau. Une teneur minimale en O₂ dans le substrat est donc déterminante pour la dégradation du bois par les champignons à la fois de type pourriture blanche et pourriture brune. Cette relation peut

s'expliquer par plusieurs mécanismes. D'une part, les mécanismes non-enzymatiques utilisés par les champignons dégradeurs de bois, dont les CMF (voir paragraphe 2.1.2 de la discussion), sont des mécanismes oxydatifs, impliquant la formation de ROS. Ces mécanismes ont été largement étudiés pour leur importance dans la dégradation du bois par les pourritures brunes (Arantes and Goodell, 2014; Castaño et al., 2018; Zhang et al., 2019) et ont été démontrés également pour des espèces associées aux MDB telles que *E. lata*, *Botryosphaeria parva* (Ascomycota, Botryosphaeriaceae), *Phomopsis viticola* (Ascomycota, Diaporthaceae), *P. chlamydospora* et *P. minimum* (Freitas et al., 2009; Perez-Gonzalez et al., 2022). Ils peuvent également faciliter la dégradation de la lignine par les champignons de pourriture blanche comme décrit précédemment (paragraphe 2.1.2). D'autre part, les mécanismes enzymatiques utilisés par les pourritures blanches pour dégrader la lignine sont stimulés par une teneur plus importante en oxygène. Par exemple, un air enrichi en O₂ (jusqu'à 80%, complété par du diazote) augmente le taux de dégradation de la lignine par *P. chrysosporium* jusqu'à 5 fois sans que cela ne puisse être expliqué par une augmentation du taux de respiration (Bar-Lev and Kirk, 1981). Ceci peut être expliqué au moins en partie par le fait que l'activité des enzymes ligninolytiques, tant des LiPs que des MnPs, nécessite la présence d'oxygène et de ROS tels que le H₂O₂ (Tien and Kirk, 1983; Kirk et al., 1984; Singh and Chen, 2008). Les activités des LiPs et des MnPs de Fmed et des LiPs de Tver lors de nos expérimentations ont donc pu être stimulées par les renouvellements réguliers de la teneur en oxygène.

3. Des traits caractéristiques de *F. mediterranea* peuvent-ils contribuer à son adaptation au bois de vigne ?

3.1. Traits morphologiques

La morphologie de Fmed est distincte de celle de Tver mais celle-ci est similaire en culture sur sciure de bois ou sur milieu de culture avec ou sans bûchettes de bois. Le mycélium de Fmed est aérien, blanc au départ et rapidement coloré de jaunâtre à brunâtre. Cette morphologie est cohérente avec la description de différentes souches de Fmed sur malt-agar à 30°C (Fischer, 2002; Annexe 3: Moretti et al., 2021). Au contraire, le mycélium de Tver est plat (cantoné à son substrat), homogène et blanc. Cette morphologie est similaire à celle observée en culture sur milieu solide (Figure 38a et b). La seule exception est observée sur sciure de vigne, où le mycélium de la souche Tver BRFM1532 montre une coloration jaune (Figure 18). La morphologie d'une espèce peut contribuer à son adaptation à sa niche écologique (Lehmann et al., 2019). La longueur des hyphes peut par exemple faciliter la recherche de nutriments sur une

Discussion

plus ou moins grande distance. Le transport de nutriments (issus du substrat ou du recyclage du mycélium) et d'autres molécules (signaux de défense notamment) au sein des cellules hyphales est un mécanisme important pour la croissance des champignons filamenteux (Schmieder et al., 2019). Les différences observées entre espèces partageant une même niche écologique peuvent également être liées à une complémentarité entre ces espèces (Lehmann et al., 2019).

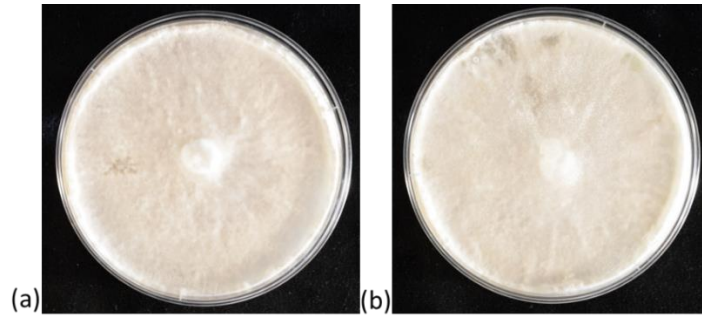


Figure 37 : morphologies des souches Tver BRFM1218 et Tver BRFM1532 sur P25 après 14 jours de culture à 27°C. (© Marion Schilling)

En fonction de leur substrat et de leur environnement, les champignons filamenteux sont capables de moduler leur morphologie, en particulier le diamètre, le degré de ramification et la vitesse de croissance de leurs hyphes (Dynesén and Nielsen, 2003; Ordaz et al., 2012). De telles modulations ont en effet été observées lors de nos expériences préliminaires en cas d'absence ou de faible teneur en azote (Figures 35 et 36), ou dans le cas de Tver BRFM1532 sur sciure de vigne (Figure 18). D'autres expériences préliminaires ont montré que la souche Fmed phco36 a une morphologie similaire sur différents milieux riches (dont malt-agar et P25) à 25 et 30°C, mais différente sur le milieu minimal Tien & Kirk (TK) (Figure 39). Sur milieu malt-agar, tout comme pour Fmed, 18 souches de Tver ont montré la même morphologie, mais celle-ci différait sur des milieux de culture différents notamment les milieux P25 et TK (Deroy, 2015). La morphologie de Fmed sur ces milieux suggère donc qu'il soit capable de moduler son comportement en fonction des éléments nutritifs dont il dispose. En complément des expérimentations préliminaires réalisées avec différents teneurs en azote (paragraphe 2.1.1. de la discussion), l'importance de la teneur en différents éléments nutritifs serait donc également un facteur important à étudier pour mieux comprendre l'adaptation de Fmed à son substrat.

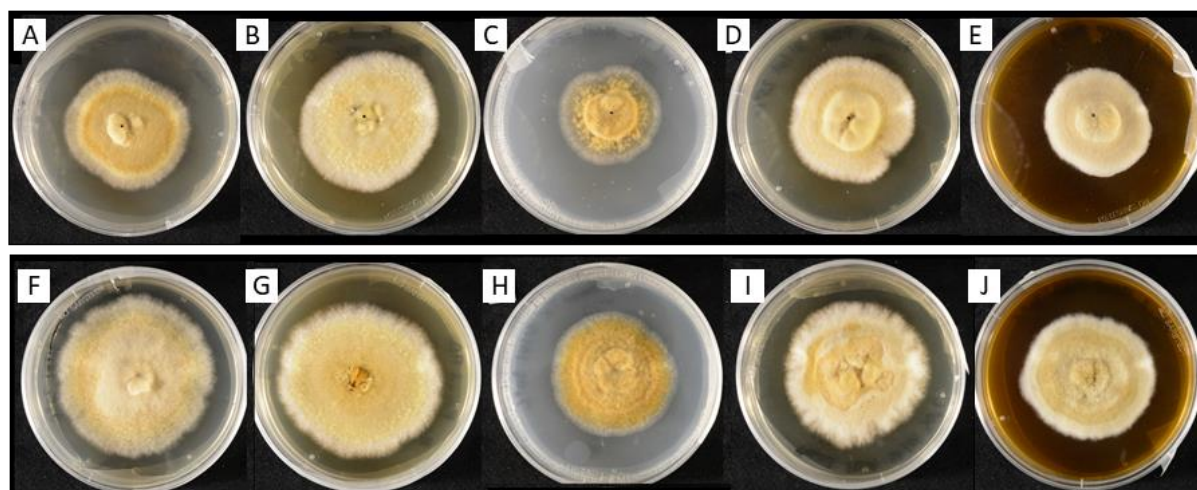


Figure 38: morphologie de *Fmed* (souche *phco36*) après 2 semaines sur différents milieux de culture solides à 25 (A-E) ou 30°C (F-J). A et F: malt-agar (2-3%), B et G: P25, C et H: milieu minimal Tien and Kirk, D et I: Potatoe Dextrose Agar (PDA), E et J: malt-agar avec peptone de levure (MAYPD). Pour la composition du milieu P25 voir chapitre 1 (© Marion Schilling).

La pigmentation des mycéliums de *Fmed* et de *Tver* peut également jouer un rôle dans leurs mécanismes d'adaptation. Les champignons filamenteux sont en effet capables de synthétiser des pigments, dont les rôles sont multiples. Parmi les pigments fongiques les plus répandus, la mélanine peut jouer le rôle d'antioxydant, d'antiradicalaire, de photo-protecteur, de chélateur de métaux ou de fixateur de composés organiques (Tran-Ly et al., 2020). Différents types de mélanine sont produits par les organismes vivants. Chez les champignons, plantes et bactéries, les mélanines font partie des allomélanines, c'est-à-dire qu'elles sont non-azotées et dérivent de différents précurseurs tels que le catéchol ou le dihydroxynaphtalène. On trouve deux types d'allomélanines chez les champignons : les 1,3,6,8-tetrahydroxynaphtalene (DHN)-mélanines (synthétisée à partir de malonyl-coenzyme A, Figure 40a) et les pyomélanines (synthétisées à partir de tyrosine (Figure 40b) (Ribera et al., 2019; Tran-Ly et al., 2020). Leur formation implique l'activité d'enzymes oxydatives telles que des laccases. Elles ont des nuances de brun, jaunâtre ou plus rarement rougeâtre à noir, et sont généralement accumulées dans les parois cellulaires mais peuvent également être sécrétées. Bien que les mélanines sont les pigments fongiques les plus communs, d'autres pigments, tels que des caroténoïdes (jaune, orange ou rouge) mais également des pigments bleu, rouge ou vert peuvent être produits par les champignons (Tudor et al., 2013). Leur apparition dépend entre autres facteurs du pH du substrat (comme cela a été montré pour *Tver*), de la disponibilité de certains nutriments ou de la température.

Discussion

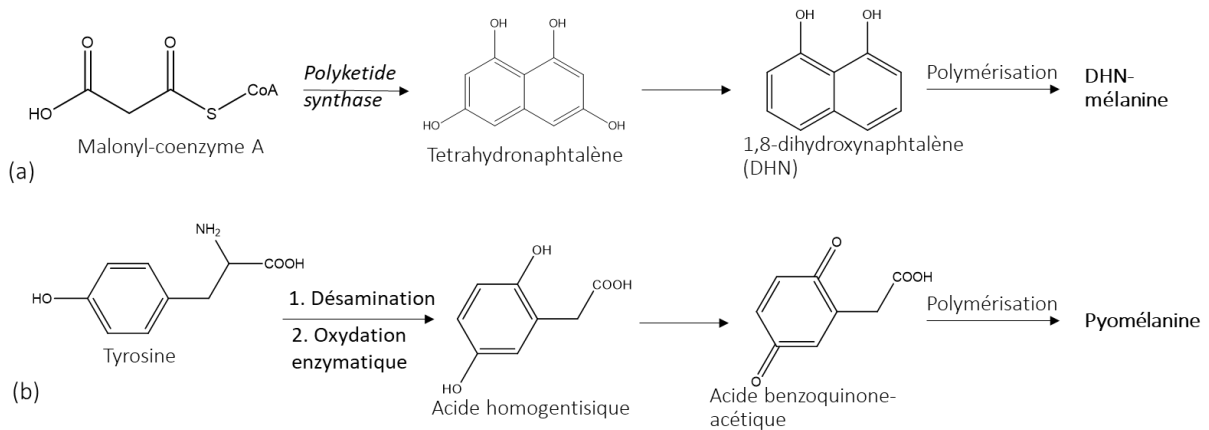


Figure 39: principales voies de biosynthèse des mélanines fongiques (a) 1,8-DiHydroNaphtalène (DHN)-mélanine et (b) pyomélanine (adapté de Tran-Ly et al., 2020).

Une des spécificités de Fmed observées sur tous les substrats étudiés est également la formation d'un mycélium aérien. Le rôle des hyphes aériens dans l'assimilation de l'oxygène a été évoqué dans la partie précédente (paragraphe 2.5). Leur formation a été observée pour d'autres champignons dégradateurs de bois notamment la pourriture blanche pathogène du bois de conifères *Heterobasidion annosum* ou le saprophyte *Schizophyllum commune* (*Basidiomycota*, *Schizophyllaceae*) (Wösten et al., 1999; Karlsson et al., 2007). Ils sont de plus associés à la présence et à la sécrétion d'hydrophobines, des petites protéines impliquées notamment dans l'adhésion des hyphes, en particulier sur des surfaces hydrophobes, mais aussi dans la pathogénicité ou la fructification (Wösten, 2001; Tao et al., 2019). Ces protéines ont co-évolué avec les champignons filamenteux et pourraient jouer un rôle clé dans leur adaptation à leur environnement (Bayry et al., 2012; Quarantin et al., 2019; Cai et al., 2020, 2021). Il serait intéressant de savoir si Fmed possède des gènes codant pour des hydrophobines, et d'étudier leur(s) rôle(s) dans son adaptation.

3.2. Autres traits caractéristiques

D'autres traits de comportement spécifiques de Fmed, observés dans les expériences réalisées, pourraient être impliqués dans son adaptation à son environnement naturel. Parmi ces traits on peut retenir notamment : (i) un schéma de dégradation de type simultané sur tous les substrats testés et dégradés, (ii) des taux de minéralisation et de dégradation du bois sur sciure relativement faibles (par rapport à Tver), mais une tendance à dégrader davantage le bois de vigne en bûchette que Tver, (iii) la capacité à moduler son sécrétome, augmentant notamment la proportion d'oxydoréductases y compris des laccases sur un substrat riche en extractibles tel que la vigne, (iv) la production d'exsudats contenant des métabolites spécialisés aux potentielles propriétés biologiques variées, (v) une croissance relativement lente sur différents

Discussion

milieux de culture (riche ou carencé en azote par exemple), et (vi) une faible compétitivité en co-culture face à la majorité des espèces testées (résultats préliminaires), mais la capacité à se développer au détriment de certaines espèces (y compris *P. chlamydospora* (Sparapano et al., 2000)).

Le schéma de dégradation du bois adopté par les pourritures blanches, de type sélectif ou simultané, peut être un facteur d'adaptation. Le schéma de dégradation sélectif (ou préférentiel), c'est-à-dire lorsque la lignine est préférentiellement dégradée, est également recherché pour son potentiel de valorisation industrielle. D'un point de vue écologique, il contribue à la complémentarité des espèces cohabitant au sein d'une niche écologique. Fmed a adopté un mode de dégradation de type simultané sur sciure et bûchettes de différentes espèces de bois (vigne cv. 'Gewurztraminer' et 'Riesling', hêtre, chêne peu dense). Ces observations sont cohérentes avec d'autres données obtenues sur des bûchettes de bois de vigne ('Teroldego' et 'Gewurztraminer') (Pacetti et al., 2022). Cependant, lors d'observations microscopiques de bois de vigne ('Riesling' et 'Sauvignon blanc') colonisé naturellement par Fmed, un schéma de dégradation typique d'une dégradation sélective, voire de type pourriture molle a été observé (Pacetti et al. 2022). En effet, d'un point de vue microscopique, la dégradation sélective est caractérisée par la disparition de la lamelle moyenne, riche en lignine, avant celle de la paroi secondaire, riche en cellulose (Blanchette, 1991). Au contraire, lors d'une dégradation de type simultanée, les parois cellulaires et la lamelle moyenne sont progressivement dégradées sans distinction. On peut également reconnaître par observation microscopique une dégradation de type pourriture molle, caractérisée par des cavités au sein des parois cellulaires (type 1), ou par une dégradation progressive de ces dernières, à proximité des hyphes (type 2), sans dégradation de la lamelle moyenne (Blanchette et al., 2004; Schwarze, 2007). Les conditions de culture *in vitro* dans lesquelles a été observé le schéma de dégradation de type simultané ont donc pu modifier le comportement de Fmed. Une telle modification peut être due par exemple à la présence *in vivo* d'autres micro-organismes, à la réponse de la vigne (synthèse *de novo* et/ou accumulation d'extractibles), ou à différents taux d'humidité et d'oxygène, pH, ou teneurs en nutriments. Il serait intéressant de vérifier le schéma de dégradation de Fmed *in vivo* et d'étudier l'impact des différents facteurs cités sur celui-ci. Parmi ces facteurs, la présence d'autres micro-organismes pourrait être d'une importance particulière, puisque différents schémas de dégradation peuvent jouer un rôle sur la capacité de différents micro-organismes à partager une même niche écologique. Il est possible par exemple qu'en présence d'autres micro-organismes, en particulier des pourritures brunes ou molles qui dégraderaient davantage les polysaccharides,

Discussion

Fmed au contraire modifie son comportement afin de dégrader préférentiellement la lignine, partageant ainsi les ressources entre micro-organismes.

La croissance relativement lente observée pour Fmed, et sa relative faible compétitivité sont des traits caractéristiques d'espèces de champignons dégradeurs de bois de type « S », c'est-à-dire tolérants au stress (Boddy, 2001). Ces dernières ont généralement une forte spécificité envers leur substrat, et sont souvent retrouvées dans le bois de cœur des arbres, ou le bois mort. D'autres espèces, généralement d'autres ordres que celui des *Basidiomycota*, sont associées au type « R » (pour rudéral), à croissance rapide, et souvent identifiées à des stades plus précoces. Les espèces de type « R » ont d'abord été considérées comme nécessaires à une pré-dégradation du bois permettant ensuite une colonisation par les *Basidiomycota*. Selon la même hypothèse, il était longtemps considéré que la pré-dégradation du bois de vigne par les espèces *P. chlamydospora* et *P. minimum* était nécessaire à la colonisation par Fmed. Cette hypothèse est remise en cause par plusieurs études montrant la capacité de Fmed à croître sur du bois de vigne sain et en l'absence d'autres espèces « pré-colonisatrices », comme l'ont également montré les expériences réalisées (chapitres 1 et 2). La présence de *P. chlamydospora* et de *P. minimum* à des stades plus précoces de dégradation du bois de vigne serait donc, comme pour d'autres espèces colonisatrices des bois de forêt, due uniquement à leur vitesse de croissance plus rapide que celle de Fmed (Boddy, 2001). La prévalence de Fmed dans un deuxième temps serait quant à elle due à une croissance plus lente et à sa capacité à se développer dans un environnement hostile pour la plupart des autres espèces.

Les oxydoréductases sécrétées par Fmed, en particulier les MnPs et les laccases, font partie des mécanismes essentiels à son développement sur un substrat difficile à coloniser. La proportion plus importante d'oxydoréductases et de laccases dans le sécrétome de Fmed sur vigne que sur hêtre est cohérente avec leurs rôles dans la dégradation de la lignine et dans la détoxification. En effet dans l'étude réalisée le bois de vigne était initialement plus riche en lignine et en extractibles que le bois de hêtre (chapitre 1, Schilling et al., 2022). Différents facteurs et différents mécanismes peuvent être à l'origine de la modulation du sécrétome de Fmed. La production et les activités de laccases de Tver sont induites par la présence d'extraits aqueux de bois (résineux et feuillus), jusqu'à une certaine concentration, au-delà de laquelle ces extraits ont un effet inhibiteur sur la croissance fongique (Bertrand et al., 2014). Le pH et la teneur en sel (NaCl) influencent également les activités laccases. L'induction ou la répression de la transcription de gènes codant pour des laccases est observée en fonction de la teneur en métaux et en nutriments (azote, carbone) du milieu mais également en présence de différents composés

Discussion

aromatiques (Piscitelli et al., 2011). De plus, l'effet inducteur (le plus fréquent) ou répresseur de ces composés aromatiques (catéchol, acides phénoliques, hydroquinone, etc.) dépend de l'espèce fongique. Par exemple, le diméthylphénol induit l'expression de gènes codant pour des laccases chez le champignon pathogène *Steccherium ochraceum* (*Basidiomycota*, *Steccherinaceae*), mais les réprime chez Tver. La régulation de la production de LiPs et de MnPs dépend elle aussi de plusieurs facteurs, notamment de la composition du substrat. Une faible teneur en azote par exemple augmente l'activité ligninolytique des pourritures blanches. La teneur en Mn^{2+} , quant à elle, a un effet plus spécifique. Elle est corrélée positivement à la production de MnPs et anticorrélée à la production de LiPs. Cette régulation pourrait avoir un rôle dans la colonisation du bois par les pourritures blanches possédant les deux types de peroxydases, dont les activités peuvent être complémentaires (Bonnarme and Jeffries, 1990). Cependant, peu d'études décrivent l'effet de différentes compositions et teneurs en lignine ou de la nature et des teneurs en extractibles sur l'expression, la production et l'activité des peroxydases de classe II. Il serait intéressant d'étudier le rôle exact de la composition du substrat dans la régulation observée du sécrétome de Fmed. Des analyses transcriptomiques et d'activités enzymatiques, réalisées à partir de dispositifs expérimentaux similaires, et en faisant varier uniquement la teneur en lignine ou en extractibles permettraient par exemple de mieux comprendre la régulation et le rôle des oxydoréductases de Fmed.

Les polysaccharides formant les hémicelluloses peuvent eux-aussi être dégradés préférentiellement ou non, en fonction du substrat et de l'espèce fongique (Worrall et al., 1997). Sur du bois de bouleau par exemple, des pourritures blanches et brunes tendent à dégrader le mannose préférentiellement. Sur du bois de pin argenté (*Pinus monticola*) au contraire, les pourritures blanches dégradent (faiblement) préférentiellement le xylose alors que les pourritures brunes dégradent préférentiellement le mannose et le xylose (Highley and Illman, 1990). Dans nos expérimentations, la composition en polysaccharides des hémicelluloses des bois utilisés, et leur schéma de dégradation précis par Fmed et Tver n'ont pas été étudiés. Il serait donc intéressant également d'une part de décrire plus précisément la composition en polysaccharides du bois de vigne et de la comparer à d'autres bois, et d'autre part d'étudier si le schéma de dégradation des polysaccharides adopté par Fmed peut être un facteur d'adaptation à sa niche écologique.

La capacité de Fmed à dégrader le bois sain *in vitro* laisse ouverte la question de sa pathogénicité. Différentes stratégies de champignons dégradeurs de bois et pourritures blanches pathogènes existent : la colonisation externe ou ectotrophique par les racines, la colonisation

Discussion

par une blessure ou par la production d'un chancre. Ces trois stratégies résultent ensuite à la destruction des cellules vivantes du bois et à la production de pectinases détruisant les membranes des ponctuations et perforations, réduisant la capacité naturelle du bois à empêcher la colonisation. Par exemple, *Chondrostereum purpureum* (*Basidiomycota*, *Meruliaceae*), est un champignon dégradateur de bois à l'origine du plomb parasitaire, maladie d'arbres fruitiers tels que le prunier, qui pénètre par les plaies de taille (Reina et al., 2019). Il est intéressant de noter que le génome de cette espèce contient 45 gènes codants pour des laccases, 2 pour des MnPs, 2 pour des peroxydases génériques et aucun pour des LiPs (Reina et al., 2019). De plus, elle sécrète en culture liquide (extrait de malt-dextrose-peptone) des sesquiterpénoïdes dérivés du sterpurène (Figure 41a), tels que l'acide sterpurique (Figure 41b) et le sterpurene-3,12,14 triol (Figure 41c), deux composés aux activités phytotoxiques (Ayer et al., 1981; Strunz et al., 1997). L'activité phytotoxique de *C. purpureum* (= *Stereum purpureum*) a également été attribuée à une protéine sécrétée, ayant une activité endo-polygalacturonase (Miyairi et al., 1977).

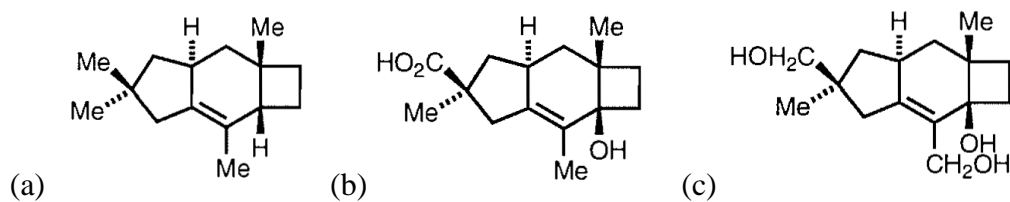


Figure 40: structure chimique (a) du sterpurène, sesquiterpénoïde identifié dans le mycélium de *C. purpureum* et de certains de ses dérivés, aux activités phytotoxiques: (b) l'acide sterpurique et (c) le sterpurene-3,12,14 triol (Strunz et al., 1997).

Stereum sanguinolentum (*Basidiomycota*, *Stereaceae*) est un autre exemple de dégradateur de bois pathogène, touchant surtout les conifères et en particulier les épicéas, pénétrant par blessure (Roll-Hansen and Roll-Hansen, 1980). Tout comme d'autres espèces du genre *Stereum*, et d'autres *Basidiomycota*, il est capable de synthétiser des sesquiterpénoïdes (Ayer and Browne, 1981; Bunyapaiboonsri et al., 2014). Les sesquiterpénoïdes et les polycétides sont les plus grandes familles de phytotoxines fongiques (Xu et al., 2021). Les modes d'actions et propriétés de ces phytotoxines sont diverses : elles peuvent être spécifiques ou non d'un hôte ; elles peuvent aussi être soit nécessaires à la pathogénicité soit seulement un facteur supplémentaire de virulence, entraînant différents symptômes ou permettant la progression de la maladie. Leurs mécanismes d'action sont divers : elles peuvent par exemple contribuer directement à la mort des cellules de l'hôte, ou interférer avec les mécanismes de défense ou de programmation de la mort cellulaire de ce dernier. Fmed est capable de produire en milieu de culture liquide deux molécules ayant montré des activités phytotoxiques : le 4-

Discussion

hydroxybenzaldehyde et le 6-formyl-2,2-diméthyl-4-chromanone (Tabacchi et al., 2000). Les activités phytotoxiques de ces composés ont été démontrées sur des protoplastes et des cals de *V. vinifera*, et sur des jeunes boutures de tomates. Cependant, l'identification et la compréhension du rôle *in vivo* de phytotoxines associées aux GTDs et en particulier à Fmed est rendue complexe par le nombre d'espèces microbiennes et leurs interactions au sein d'un cep de vigne (Masi et al., 2018). Les phytotoxines produites *in vitro* par Fmed n'ont pas été identifiées *in vivo*, et le sont rarement pour l'ensemble des espèces associées aux GTDs. L'eutypine, produite par *E. lata*, associé à l'eutypiose, est une des rares phytotoxines identifiées dans l'inflorescence et la sève de ceps de vigne malades (Tey-Rulh et al., 1991). Cette dernière affecte plusieurs fonctions essentielles de la plante : son système photosynthétique (dégradation du chloroplaste, ...), probablement ses mitochondries (altération du taux de respiration et de la balance énergétique), et induit l'accumulation d'acide abscissique dans les feuilles. Les autres phytotoxines associées aux GTDs agissent probablement par l'obstruction du flux de sève brute. Il serait intéressant d'étudier le rôle *in vivo* de phytotoxines produites par Fmed. Ces phytotoxines n'ont pas été retrouvées lors de sa croissance sur bûchettes de vigne (Chapitre 2). Il est possible que les conditions expérimentales n'induisent pas leur production, ou qu'elles étaient présentes en trop faible quantité par rapport à l'ensemble des autres métabolites détectés pour qu'il soit possible de les identifier. Il serait intéressant de faire varier les conditions expérimentales afin d'observer éventuellement des facteurs qui favorisent la production de phytotoxines, ainsi que d'améliorer le procédé d'extraction afin de rechercher plus spécifiquement d'éventuels métabolites sécrétés dans le bois. Des analyses transcriptomiques permettraient également de mettre en évidence des mécanismes moléculaires spécifiques à certains substrats ou conditions de culture.

Conclusion générale

Différents aspects des mécanismes d'adaptation de Fmed à sa niche écologique, le bois de vigne au vignoble, ont été étudiés. Des traits spécifiques du comportement de Fmed ont été observés, et l'importance de différents facteurs, biotiques et abiotiques, pouvant influencer le comportement de Fmed et être à l'origine de son adaptation ont été discutés. Une attention particulière a été portée à la structure et à la composition chimique de son substrat, le bois de vigne. Les expériences ont montré que Fmed est capable de dégrader le bois de vigne sain, qu'il adopte un schéma de dégradation de type simultané, et qu'il est capable de dégrader les extractibles du bois de vigne, tout comme le modèle de pourriture blanche utilisé, Tver. Plus spécifiquement, Fmed a également montré une morphologie typique, aérienne et colorée (jaunâtre), une croissance plutôt lente, une faible compétitivité sauf face à quelques espèces. Enfin sa capacité à réguler son sécrétome en fonction de son substrat a été observé, en particulier la régulation de la proportion d'oxydoréductases, dont les peroxydases de classe II et les laccases, impliquées dans la dégradation de la lignine et potentiellement dans la détoxification.

Lorsque le bois de vigne est réduit en sciure, Fmed dégrade cette espèce davantage que le bois de hêtre et encore davantage que le bois d'épicéa. Cependant, le champignon de pourriture blanche modèle Tver, absent du vignoble, dégrade davantage le bois de vigne que Fmed. Lorsque la structure tridimensionnelle du bois est conservée, lors de la colonisation de bûchettes de bois, Fmed dégrade davantage le bois de chêne, lorsqu'il est peu dense, que le bois de vigne et de hêtre. Une tendance à dégrader davantage le bois de vigne par rapport à Tver est observée, mais une grande variabilité de réponse entre les bûchettes de bois de vigne et entre les deux souches de Fmed est observée. L'ensemble de ces observations suggère que d'autres facteurs, autres que la composition structurale et chimique du substrat, soient nécessaires pour expliquer l'adaptation de Fmed au vignoble. Les rôles des conditions environnementales, la réponse du bois de vigne ou de la composition des communautés microbiennes ont notamment été discutés.

Les expériences réalisées *in vitro* ont permis d'étudier précisément l'influence de la composition initiale du substrat, le bois de vigne, sur le comportement de Fmed. Cependant, les facteurs pouvant expliquer l'adaptation de Fmed au vignoble sont multiples et probablement inter-corrélés. Il serait donc intéressant à présent d'étudier plus précisément le rôle de chacun de ces facteurs, et de combinaisons de ces facteurs, sur le comportement de Fmed. Les approches physiologiques, métabolomiques et protéomiques adoptées au cours des expérimentations présentées ont permis une large visualisation de traits caractéristiques de

Conclusion

Fmed. Elles pourraient être appliquées à d'autres plans d'expérimentation et complétées par d'autres approches, notamment transcriptomiques. Il serait intéressant par exemple d'élargir les connaissances sur les mécanismes de dégradation du bois par Fmed, en présence de différentes communautés microbiennes du bois de vigne, ou encore dans le cas de variations des conditions micro-environnementales. L'amélioration de protocoles spécifiques permettrait également de prendre en compte la dimension spatio-temporelle de ces mécanismes.

Références

- Abou-Mansour, E., Polier, J., Pezet, R., and Tabacchi, R. (2009). Purification and partial characterisation of a 60 KDa laccase from *Fomitiporia mediterranea*. *Phytopathol. Mediterr.* 48, 447–453.
- Adomas, A., Eklund, M., Johansson, M., and Asiegbu, F. O. (2006). Identification and analysis of differentially expressed cDNAs during nonself-competitive interaction between *Phlebiopsis gigantea* and *Heterobasidion parviporum*: Interspecific interaction between *H. parviporum* and *P. gigantea*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57, 26–39. doi: 10.1111/j.1574-6941.2006.00094.x.
- Agrelli, D., Amalfitano, C., Conte, P., and Mugnai, L. (2009). Chemical and spectroscopic characteristics of the wood of *Vitis vinifera* cv. Sangiovese affected by Esca disease. *J. Agric. Food Chem.* 57, 11469–11475. doi: 10.1021/jf903561x.
- Aguamah, G. E., Langcake, P., Leworthy, D. P., Page, J. A., Pryce, R. J., and Strange, R. N. (1981). Two novel stilbene phytoalexins from *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry* 20, 1381–1383. doi: 10.1016/0031-9422(81)80044-1.
- Akhtar, N., Perween, S., Ansari, A., and Ahmad, M. R. (2020). Life style of fungi from biotrophy to necrotrophy and saprotrophy. *Int. J. Agric. Appl. Sci.* 1, 93–103. doi: 10.52804/ijaas2020.1118.
- Aliferis, K. A., and Jabaji, S. (2010). Metabolite composition and bioactivity of *Rhizoctonia solani* sclerotial exudates. *J. Agric. Food Chem.* 58, 7604–7615. doi: 10.1021/jf101029a.
- Amalfitano, C., Agrelli, D., Arrigo, A., Mugnai, L., Surico, G., and Evidente, A. (2011). Stilbene polyphenols in the brown red wood of *Vitis vinifera* cv. Sangiovese affected by “esca proper.” *Phytopathol. Mediterr.* 50, S224–S235.
- Andolfi, A., Mugnai, L., Luque, J., Surico, G., Cimmino, A., and Evidente, A. (2011). Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. *Toxins* 3, 1569–1605. doi: 10.3390/toxins3121569.
- Arantes, V., and Goodell, B. (2014). “Current understanding of brown-rot fungal biodegradation mechanisms: A review,” in *Deterioration and Protection of Sustainable Biomaterials ACS Symposium Series.*, eds. T. P. Schultz, B. Goodell, and D. D. Nicholas (Washington, DC: American Chemical Society), 3–21. doi: 10.1021/bk-2014-1158.ch001.
- Arantes, V., and Milagres, A. M. F. (2007). The synergistic action of ligninolytic enzymes (MnP and Laccase) and Fe³⁺-reducing activity from white-rot fungi for degradation of Azure B. *Enzyme Microb. Technol.* 42, 17–22. doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.07.017.
- Arantes, V., Milagres, A. M. F., Filley, T. R., and Goodell, B. (2011). Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 541–555. doi: 10.1007/s10295-010-0798-2.
- Ayer, W. A., and Browne, L. M. (1981). Terpenoid metabolites of mushrooms and related basidiomycetes. *Tetrahedron* 37, 2197–2248. doi: 10.1016/S0040-4020(01)97979-7.
- Ayer, W. A., Saeedi-Ghomi, M. H., Engen, D. V., Tagle, B., and Clardy, J. (1981). The sterpuric acids: a new type of sesquiterpenoid. *Tetrahedron* 37, 379–385. doi: 10.1016/0040-4020(81)85074-0.
- Bandounas, L., Wierckx, N. J., de Winde, J. H., and Ruijsenaars, H. J. (2011). Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting ligninolytic potential. *BMC Biotechnol.* 11, 94. doi: 10.1186/1472-6750-11-94.
- Bar Nun, N., Tal Lev, A., Harel, E., and Mayer, A. M. (1988). Repression of laccase formation in *Botrytis cinerea* and its possible relation to phytopathogenicity. *Phytochemistry* 27, 2505–2509. doi: 0031-9422/88.

- Bar-Lev, S. S., and Kirk, T. K. (1981). Effects of molecular oxygen on lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99, 373–378. doi: 10.1016/0006-291X(81)91755-1.
- Bavaresco, L., Cantù, E., and Trevisan, M. (2000). Chlorosis occurrence, natural arbuscular-mycorrhizal infection and stilbene root concentration of ungrafted grapevine rootstocks growing on calcareous soil. *J. Plant Nutr.* 23, 1685–1697. doi: 10.1080/01904160009382133.
- Bavaresco, L., and Fregoni, C. (2001). “Chapter 6 Physiological role and molecular aspects of grapevine stilbenic compounds,” in *Molecular biology & biotechnology of the grapevine* (Heraklion, G: Springer Science).
- Bavaresco, L., Pezzutto, S., Fornaroli, A., and Ferrari, F. (2003). Grapevine iron-chlorosis occurrence and stilbene root concentration as affected by the rootstock and arbuscular mycorrhizal infection. *Acta Hort.*, 401–410. doi: 10.17660/ActaHortic.2003.603.51.
- Bavaresco, L., Pezzutto, S., Gatti, M., and Mattivi, F. (2007). Role of the variety and some environmental factors on grape stilbenes. *Vitis* 46, 57–61.
- Bayry, J., Aïmanianda, V., Guijarro, J. I., Sunde, M., and Latgé, J.-P. (2012). Hydrophobins—Unique fungal proteins. *PLoS Pathog.* 8, e1002700. doi: 10.1371/journal.ppat.1002700.
- Beneventi, E., Conte, S., Cramarossa, M. R., Riva, S., and Forti, L. (2015). Chemo-enzymatic synthesis of new resveratrol-related dimers containing the benzo[b]furan framework and evaluation of their radical scavenger activities. *Tetrahedron* 71, 3052–3058. doi: 10.1016/j.tet.2014.11.012.
- Bérdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J. Antibiot. (Tokyo)* 65, 385–395. doi: 10.1038/ja.2012.27.
- Bermingham, S., Maltby, L., and Cooke, R. C. (1995). A critical assessment of the validity of ergosterol as an indicator of fungal biomass. *Mycol. Res.* 99, 479–484. doi: 10.1016/S0953-7562(09)80650-3.
- Bertrand, B., Martínez-Morales, F., Tinoco, R., Rojas-Trejo, S., Serrano-Carreón, L., and Trejo-Hernández, M. R. (2014). Induction of laccases in *Trametes versicolor* by aqueous wood extracts. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 135–142. doi: 10.1007/s11274-013-1420-3.
- Bertsch, C., Ramírez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E., et al. (2013). Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood: *Grapevine trunk diseases*. *Plant Pathol.* 62, 243–265. doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02674.x.
- Bills, G. F., Gloer, J. B., Heitman, J., Howlett, B. J., and Stukenbrock, E. H. (2016). Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. *Microbiol. Spectr.* 4, 4.6.01. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0009-2016.
- Binbuga, N., Ruhs, C., Hasty, J. K., Henry, W. P., and Schultz, T. P. (2008). Developing environmentally benign and effective organic wood preservatives by understanding the biocidal and non-biocidal properties of extractives in naturally durable heartwood. *Holzforschung* 62. doi: 10.1515/HF.2008.038.
- Blanchette, R. A. (1991). Delignification by Wood-Decay Fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29, 381–398.
- Blanchette, R. A., Held, B. W., Jurgens, J. A., McNew, D. L., Harrington, T. C., Duncan, S. M., et al. (2004). Wood-destroying soft rot fungi in the historic expedition huts of Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1328–1335. doi: 10.1128/AEM.70.3.1328-1335.2004.
- Boddy, L. (2000). Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31, 185–194. doi: 10.1111/j.1574-6941.2000.tb00683.x.
- Boddy, L. (2001). Fungal community ecology and wood decomposition processes in Angiosperms: From standing tree to complete decay of coarse woody debris. *Ecol. Bull.* 49, 43–56.

- Boddy, L., Gibbon, O. M., and Grundy, M. A. (1985). Ecology of *Daldinia concentrica*: Effect of abiotic variables on mycelial extension and interspecific interactions. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 85, 201–211. doi: 10.1016/S0007-1536(85)80183-2.
- Boddy, L., and Heilmann-Clausen, J. (2008). “Basidiomycete community development in temperate Angiosperm wood,” in *Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes* Academic Press. (The Netherlands: Elsevier), Chapter 12, 211-237.
- Bonnarme, P., and Jeffries, T. W. (1990). Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 210–217. doi: 10.1128/aem.56.1.210-217.1990.
- Bouriaud, O., Bréda, N., Le Moguédec, G., and Nepveu, G. (2004). Modelling variability of wood density in beech as affected by ring age, radial growth and climate. *Trees* 18, 264–276. doi: 10.1007/s00468-003-0303-x.
- Brefort, T., Scherzinger, D., Limón, M. C., Estrada, A. F., Trautmann, D., Mengel, C., et al. (2011). Cleavage of resveratrol in fungi: Characterization of the enzyme Rco1 from *Ustilago maydis*. *Fungal Genet. Biol.* 48, 132–143. doi: 10.1016/j.fgb.2010.10.009.
- Breuil, A.-C., Jeandet, P., Adrian, M., Chopin, F., Pirio, N., Meunier, P., et al. (1999). Characterization of a pterostilbene dehydrodimer produced by laccase of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 89, 298–302. doi: 10.1094/PHYTO.1999.89.4.298.
- Brown, J. A., Alic, M., and Gold, M. H. (1991). Manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*: activation by manganese. *J. Bacteriol.* 173, 4101–4106. doi: 10.1128/jb.173.13.4101-4106.1991.
- Bruetz, E., Haidar, R., Alou, M. T., Vallance, J., Bertsch, C., Mazet, F., et al. (2015). Bacteria in a wood fungal disease: characterization of bacterial communities in wood tissues of esca-foliar symptomatic and asymptomatic grapevines. *Front. Microbiol.* 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.01137.
- Bruetz, E., Lecomte, P., Grosman, J., Doublet, B., Bertsch, C., Ugaglia, A., et al. (2013). Overview of grapevine trunk diseases in France in the 2000s. *Phytopathol. Mediterr.* 52, 262–275. doi: 10.1111/1462-2920.15180.
- Bruetz, E., Vallance, J., Gautier, A., Laval, V., Compant, S., Maurer, W., et al. (2020). Major changes in grapevine wood microbiota are associated with the onset of esca, a devastating trunk disease. *Environ. Microbiol.* 22, 5189–5206. doi: 10.1111/1462-2920.15180.
- Bruetz, E., Vallance, J., Gerbore, J., Lecomte, P., Da Costa, J.-P., Guerin-Dubrana, L., et al. (2014). Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of Esca leaf-symptomatic and asymptomatic vines. *PLoS ONE* 9, e95928. doi: 10.1371/journal.pone.0095928.
- Brunet, R. (2021). Etude physiologique d’un champignon de pourriture blanche associé à une maladie du bois de la vigne, *Fomitiporia mediterranea*, à l’aide du modèle *Trametes versicolor* [Rapport de stage M1]. Vandoeuve-lès-Nancy, FR: Université de Lorraine.
- Bruno, G., and Sparapano, L. (2006). Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: III. Enzymes produced by the pathogens and their role in fungus-to-plant or in fungus-to-fungus interactions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 69, 182–194. doi: 10.1016/j.pmpp.2007.04.006.
- Bunyapaiboonsri, T., Yoiprommarat, S., Nopgason, R., Komwijit, S., Veeranondha, S., Puyngain, P., et al. (2014). Cadinane sesquiterpenoids from the basidiomycete *Stereum* cf. *sanguinolentum* BCC 22926. *Phytochemistry* 105, 123–128. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.06.006.
- Cai, F., Gao, R., Zhao, Z., Ding, M., Jiang, S., Yagtu, C., et al. (2020). Evolutionary compromises in fungal fitness: hydrophobins can hinder the adverse dispersal of conidiospores and challenge their survival. *ISME J.* 14, 2610–2624. doi: 10.1038/s41396-020-0709-0.

- Cai, F., Zhao, Z., Gao, R., Chen, P., Ding, M., Jiang, S., et al. (2021). The pleiotropic functions of intracellular hydrophobins in aerial hyphae and fungal spores. *PLOS Genet.* 17, e1009924. doi: 10.1371/journal.pgen.1009924.
- Calderón, A. A., Zapata, J. M., Pedreño, M. A., Muñoz, R., and Barceló, A. R. (1992). Levels of 4-hydroxystilbene-oxidizing isoperoxidases related to constitutive disease resistance in *in vitro*-cultured grapevine. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 29, 63–70. doi: 10.1007/BF00033609.
- Calzarano, F., Amalfitano, C., Seghetti, L., and Cozzolino, V. (2009). Nutritional status of vines affected with esca proper. *Phytopathol. Mediterr.* 48, 13.
- Calzarano, F., Osti, F., Baránek, M., and Di Marco, S. (2018). Rainfall and temperature influence expression of foliar symptoms of grapevine leaf stripe disease (esca complex) in vineyards. *Phytopathol. Mediterr.* 57, 488–505. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-23787.
- Campos, J. A. (2011). Nutrients and trace elements content of wood decay fungi isolated from oak (*Quercus ilex*). *Biol. Trace Elem. Res.* 144, 1370–1380. doi: 10.1007/s12011-011-9134-6.
- Canessa, P., Muñoz-Guzmán, F., Vicuña, R., and Larrondo, L. F. (2012). Characterization of PIR1, a GATA family transcription factor involved in iron responses in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genet. Biol.* 49, 626–634. doi: 10.1016/j.fgb.2012.05.013.
- Castanera, R., Borgognone, A., Pisabarro, A. G., and Ramírez, L. (2017). Biology, dynamics, and applications of transposable elements in basidiomycete fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 1337–1350. doi: 10.1007/s00253-017-8097-8.
- Castaño, J. D., Zhang, J., Anderson, C. E., and Schilling, J. S. (2018). Oxidative damage control during decay of wood by brown rot fungus using oxygen radicals. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e01937-18. doi: 10.1128/AEM.01937-18.
- Chervin, J., Romeo-Oliván, A., Fournier, S., Puech-Pages, V., Dumas, B., Jacques, A., et al. (2022). Modification of early response of *Vitis vinifera* to pathogens relating to Esca disease and biocontrol agent Vintec® revealed by untargeted metabolomics on woody tissues. *Front. Microbiol.* 13, 835463. doi: 10.3389/fmicb.2022.835463.
- Cholet, C., Bruez, É., Lecomte, P., Barsacq, A., Martignon, T., Giudici, M., et al. (2021). Plant resilience and physiological modifications induced by curettage of Esca-diseased grapevines. *OENO One* 55, 153–169. doi: 10.20870/oenone.2021.55.1.4478.
- Ciccarone, C., Graniti, A., Schiaffino, A., and Marras, F. (2004). Molecular analysis of *Fomitiporia mediterranea* isolates from esca-affected grapevines in southern Italy. *Phytopathol. Mediterr.* 43, 6.
- Cichewicz, R. H., Kouzi, S. A., and Hamann, M. T. (2000). Dimerization of resveratrol by the grapevine pathogen *Botrytis cinerea*. *J. Nat. Prod.* 63, 29–33. doi: 10.1021/np990266n.
- da Silva, A. A., do Nascimento, E. S. P., Cardoso, D. R., and Franco, D. W. (2009). Coumarins and phenolic fingerprints of oak and Brazilian woods extracted by sugarcane spirit. *J. Sep. Sci.* 32, 3681–3691. doi: 10.1002/jssc.200900306.
- Daniel, J. F. de S., and Rodrigues Filho, E. (2007). Peptaibols of *Trichoderma*. *Nat. Prod. Rep.* 24, 1128. doi: 10.1039/b618086h.
- Darnet, S., Blary, A., Chevalier, Q., and Schaller, H. (2021). Phytosterol profiles, genomes and enzymes – An overview. *Front. Plant Sci.* 12, 665206. doi: 10.3389/fpls.2021.665206.
- Davin, L. B., and Lewis, N. G. (2003). An historical perspective on lignan biosynthesis: Monolignol, allylphenol and hydroxycinnamic acid coupling and downstream metabolism. *Phytochem. Rev.* 2, 257–288. doi: 10.1023/B:PHYT.0000046175.83729.b5.
- de Carvalho, M., Weich, H., and Abraham, W.-R. (2015). Macrocyclic trichothecenes as antifungal and anticancer compounds. *Curr. Med. Chem.* 23, 23–35. doi: 10.2174/0929867323666151117121521.

- Del Frari, G., Cabral, A., Nascimento, T., Boavida Ferreira, R., and Oliveira, H. (2019a). *Epicoccum layuense* a potential biological control agent of esca-associated fungi in grapevine. *PLOS ONE* 14, e0213273. doi: 10.1371/journal.pone.0213273.
- Del Frari, G., Gobbi, A., Aggerbeck, M. R., Oliveira, H., Hansen, L. H., and Ferreira, R. B. (2019b). 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. *Front. Plant Sci.* 10, 910. doi: 10.3389/fpls.2019.00910.
- Del Frari, G., Gobbi, A., Aggerbeck, M. R., Oliveira, H., Hansen, L. H., and Ferreira, R. B. (2019c). Fungicides and the grapevine wood mycobiome: A case study on tracheomycotic ascomycete *Phaeoconiella chlamydospora* reveals potential for two novel control strategies. *Front. Plant Sci.* 10, 1405. doi: 10.3389/fpls.2019.01405.
- Del Frari, G., Oliveira, H., and Boavida Ferreira, R. (2021). White rot fungi (Hymenochaetales) and Esca of grapevine: Insights from recent microbiome studies. *J. Fungi* 7, 770. doi: 10.3390/jof7090770.
- Deroy, A. (2015). Évolution et adaptation des champignons saprophytes: les systèmes impliqués dans la dégradation du bois chez *Trametes versicolor*. [Thèse de Doctorat]. [Nancy, FR] : Université de Lorraine.
- Di Marco, S., Osti, F., and Cesari, A. (2004). Experiments on the control of esca by *Trichoderma*. *Phytopathol. Mediterr.* 43, 9.
- Djoukeng, J. D., Polli, S., Larignon, P., and Abou-Mansour, E. (2009). Identification of phytotoxins from *Botryosphaeria obtusa*, a pathogen of black dead arm disease of grapevine. *Eur. J. Plant Pathol.* 124, 303–308. doi: 10.1007/s10658-008-9419-6.
- Doehlemann, G., Berndt, P., and Hahn, M. (2006). Trehalose metabolism is important for heat stress tolerance and spore germination of *Botrytis cinerea*. *Microbiology* 152, 2625–2634. doi: 10.1099/mic.0.29044-0.
- Donoso-Fierro, C., Becerra, J., Bustos-Concha, E., and Silva, M. (2009). Chelating and antioxidant activity of lignans from Chilean woods (*Cupressaceae*). *Holzforchung* 63, 559–563. doi: 10.1515/HF.2009.123.
- Doublet, B., Grosman, J., Lecomte, P., and Bruez, E. (2014). Observatoire national des maladies du bois. *INRAE*. Available at: <https://www.maladie-du-bois-vigne.fr/layout/set/print/Les-maladies-du-bois/Observatoire-national-des-maladies-du-bois> [Accessed April 10, 2022].
- Duan, D., Halter, D., Baltenweck, R., Tisch, C., Tröster, V., Kortekamp, A., et al. (2015). Genetic diversity of stilbene metabolism in *Vitis sylvestris*. *J. Exp. Bot.* 66, 3243–3257. doi: 10.1093/jxb/erv137.
- Duan, Q., Bonn, B., and Kreuzwieser, J. (2020). Terpenoids are transported in the xylem sap of Norway spruce. *Plant Cell Environ.* 43, 1766–1778. doi: 10.1111/pce.13763.
- Duclohier, H. (2010). Antimicrobial peptides and peptaibols, substitutes for conventional antibiotics. *Curr. Pharm. Des.* 16, 3212–3223. doi: 10.2174/138161210793292500.
- Dupont, S., Lemetals, G., Ferreira, T., Cayot, P., Gervais, P., and Beney, L. (2012). Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? *Evolution* 66, 2961–2968. doi: 10.1111/j.1558-5646.2012.01667.x.
- Dynesen, J., and Nielsen, J. (2003). Branching is coordinated with mitosis in growing hyphae of *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 40, 15–24. doi: 10.1016/S1087-1845(03)00053-7.
- Edwards, J., and Pascoe, I. G. (2004). Occurrence of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and Esca in Australian grapevines. *Australas. Plant Pathol.* 33, 273–279. doi: 10.1071/AP04016.
- Eikenes, M., Hietala, A. M., Alfredsen, G., Gunnar Fossdal, C., and Solheim, H. (2005). Comparison of quantitative real-time PCR, chitin and ergosterol assays for monitoring colonization of *Trametes versicolor* in birch wood. *Holzforchung* 59, 568–573. doi: 10.1515/HF.2005.093.

- Elena, K., Fischer, M., Dimou, D., and Dimou, D. M. (2006). *Fomitiporia mediterranea* infecting citrus trees in Greece. *Phytopathol. Mediterr.* 45, 5.
- Elie, N., Santerre, C., and Touboul, D. (2019). Generation of a molecular network from electron ionization mass spectrometry data by combining MZmine2 and MetGem software. *Anal. Chem.* 91, 11489–11492. doi: 10.1021/acs.analchem.9b02802.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., and Penninckx, M. (2008). Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1531–1538. doi: 10.1007/s10295-008-0454-2.
- Eriksson, K.-E. L., Blanchette, R. A., and Ander, P. (1990). *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg doi: 10.1007/978-3-642-46687-8.
- Esteves, A. C., Saraiva, M., Correia, A., and Alves, A. (2014). Botryosphaerales fungi produce extracellular enzymes with biotechnological potential. *Can. J. Microbiol.* 60, 332–342. doi: 10.1139/cjm-2014-0134.
- Fengel, F., and Wegener, G. (1984). *Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin New York: W. de Gruyter.
- Ferreira, J. H. S. (1999). Growth of *Eutypa lata* in grapevine wood extracts. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 20, 53–56.
- Fischer, M. (2002). A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). *Mycol. Prog.* 1, 315–324. doi: 10.1007/s11557-006-0029-4.
- Fischer, M. (2006). Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine: a worldwide perspective. *Phytopathol. Mediterr.* 45, 13.
- Fischer, M., and Garcia, V. G. (2015). An annotated checklist of European basidiomycetes related to white rot of grapevine (*Vitis vinifera*). *Phytopathol. Mediterr.* 54, 281–298.
- Fliegmann, J., Schröder, G., Schanz, S., Britsch, L., and Schröder, J. (1992). Molecular analysis of chalcone and dihydropinosylvin synthase from Scots pine (*Pinus sylvestris*), and differential regulation of these and related enzyme activities in stressed plants. *Plant Mol. Biol.* 18, 489–503. doi: 10.1007/BF00040665.
- Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R. A., Henrissat, B., et al. (2012). The Paleozoic origin of enzymatic mechanisms for lignin degradation reconstructed using 31 fungal genomes. *Science* 336, 1715–1719. doi: 10.1126/science.1221748.
- Floudas, D., Held, B. W., Riley, R., Nagy, L. G., Koehler, G., Ransdell, A. S., et al. (2015). Evolution of novel wood decay mechanisms in Agaricales revealed by the genome sequences of *Fistulina hepatica* and *Cylindrobasidium torrendii*. *Fungal Genet. Biol.* 76, 78–92. doi: 10.1016/j.fgb.2015.02.002.
- Fontaine, F., Gramaje, D., Armengol, J., Smart, R., Nagy, Z. A., Borgo, M., et al. (2006). Grapevine trunk diseases. A review. Paris, FR: International Organisation of Vine and Wine (OIV).
- Freitas, R., Rego, C., Oliveira, H., and Ferreira, R. B. (2009). Interactions among grapevine disease-causing fungi. The role of reactive oxygen species. *Phytopathol. Mediterr.* 48, 117–127.
- Füchtner, S., Brock-Nannestad, T., Smeds, A., Fredriksson, M., Pilgård, A., and Thygesen, L. G. (2020). Hydrophobic and hydrophilic extractives in Norway spruce and Kurile larch and their role in brown-rot degradation. *Front. Plant Sci.* 11, 855. doi: 10.3389/fpls.2020.00855.
- Fussler, L., Kobes, N., Bertrand, F., Maumy, M., Grosman, J., and Savary, S. (2008). A characterization of grapevine trunk diseases in France from data generated by the national grapevine wood diseases survey. *Phytopathology* 98, 571–579. doi: 10.1094/PHYTO-98-5-0571.

- Gabaston, J., Leborgne, C., Waffo-Teguo, P., Valls, J., Palos Pinto, A., Richard, T., et al. (2019). Wood and roots of major grapevine cultivars and rootstocks: A comparative analysis of stilbenes by UHPLC-DAD-MS/MS and NMR. *Phytochem. Anal.* 30, 320–331. doi: 10.1002/pca.2815.
- Garcez, F. R., Núñez, C. V., Garcez, W. S., Almeida, R. M., and Roque, N. F. (1998). Sesquiterpenes, limonoid and coumarin from the wood bark of *Guarea guidonia*. *Planta Med.* 64, 79–80.
- Gareis, M., and Gottschalk, C. (2014). *Stachybotrys* spp. and the guttation phenomenon. *Mycotoxin Res.* 30, 151–159. doi: 10.1007/s12550-014-0193-3.
- Gatto, P., Vrhovsek, U., Muth, J., Segala, C., Romualdi, C., Fontana, P., et al. (2008). Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11773–11785. doi: 10.1021/jf8017707.
- Goodell, B., Winandy, J. E., and Morrell, J. J. (2020). Fungal degradation of wood: Emerging data, new insights and changing perceptions. *Coatings* 10, 1210. doi: 10.3390/coatings10121210.
- Gow, N. A. R., Latge, J.-P., and Munro, C. A. (2017). The fungal cell wall: Structure, biosynthesis, and function. *Microbiol. Spectr.* 5, 5.3.01. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016.
- Grosman, J., and Doublet, B. (2012). Maladies du bois de la vigne. Synthèse des dispositifs d’observation au vignoble, de l’observatoire 2003-2008 au réseau d’épidémiosurveillance actuel. *Phytoma*, 31–35.
- Guérin-Dubrana, L., Labenne, A., Labrousse, J. C., Bastien, S., Rey, P., and Gégout-Petit, A. (2013). Statistical analysis of grapevine mortality associated with esca or Eutypa dieback foliar expression. *Phytopathol. Mediterr.* 52, 276–288. doi: <http://www.jstor.org/stable/42685406>.
- Guerrero, R. F. (2016). Grapevine cane’s waste is a source of bioactive stilbenes. *Ind. Crops Prod.* 94, 884–892. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.09.0550926-6690.
- Habtemariam, S. (2020). *Trametes versicolor* (synn. *Coriolus versicolor*) polysaccharides in cancer therapy: Targets and efficacy. *Biomedicines* 8, 135. doi: 10.3390/biomedicines8050135.
- Haidar, R., Yacoub, A., Vallance, J., Compant, S., Antonielli, L., Saad, A., et al. (2021). Bacteria associated with wood tissues of Esca-diseased grapevines: Functional diversity and synergy with *Fomitiporia mediterranea* to degrade wood components. *Environ. Microbiol.* 23, 6104–6121. doi: 10.1111/1462-2920.15676.
- Harju, A. M., Venäläinen, M., Anttonen, S., Viitanen, H., Kainulainen, P., Saranpää, P., et al. (2003). Chemical factors affecting the brown-rot decay resistance of Scots pine heartwood. *Trees* 17, 263–268. doi: 10.1007/s00468-002-0233-z.
- Harmon, M. E., Fath, B., Woodall, C. W., and Sexton, J. (2013). Carbon concentration of standing and downed woody detritus: Effects of tree taxa, decay class, position, and tissue type. *For. Ecol. Manag.* 291, 259–267. doi: 10.1016/j.foreco.2012.11.046.
- Heilmann-Clausen, J., and Boddy, L. (2005). Inhibition and stimulation effects in communities of wood decay fungi: Exudates from colonized wood influence growth by other species. *Microb. Ecol.* 49, 399–406. doi: 10.1007/s00248-004-0240-2.
- Highley, T. L., and Illman, B. L. (1990). “Chapter 158 : Changes in cell wall components of white pine and maple by white-rot fungi,” in *Biodeterioration Research (BIOR, volume 3)*, eds. G. C. Llewellyn and C. E. O’Rear (Boston, MA: Springer US), 349–360. doi: 10.1007/978-1-4757-9453-3_28.
- Hiscox, J., and Boddy, L. (2017). Armed and dangerous – Chemical warfare in wood decay communities. *Fungal Biol. Rev.* 31, 169–184. doi: 10.1016/j.fbr.2017.07.001.
- Hofstetter, V., Buyck, B., Croll, D., Viret, O., Couloux, A., and Gindro, K. (2012). What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? *Fungal Divers.* 54, 51–67. doi: 10.1007/s13225-012-0171-z.

- Hopia, A., and Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 139–144. doi: 10.1007/s11746-999-0060-0.
- Hovelstad, H., Leirset, I., Oyaas, K., and Fiksdahl, A. (2006). Screening analyses of pinosylvin stilbenes, resin acids and lignans in Norwegian conifers. *Molecules* 11, 103–114. doi: 10.3390/11010103.
- Humar, M., Petrič, M., and Pohleven, F. (2001). Changes of the pH value of impregnated wood during exposure to wood-rotting fungi. *Holz Als Roh- Werkst.* 59, 288–293. doi: 10.1007/s001070100207.
- Idnurm, A., Bahn, Y.-S., Nielsen, K., Lin, X., Fraser, J. A., and Heitman, J. (2005). Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus Neoformans*. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 753–764. doi: 10.1038/nrmicro1245.
- INTERLOIRE (2022). Inteprofession des Vins du Val de Loire. Observatoire maladies du bois. Résultats des observations pluriannuelles 2013-2021. Available at: <https://techniloire.com/observatoire-maladie-du-bois> [Accessed September 26, 2022].
- Jamaux-Despréaux, I., and Péros, J. P. (2003). Genetic structure in populations of the fungus *Fomitiporia punctata* associated with the esca syndrome in grapevine. *Vitis* 42, 43–51.
- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.-C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., and Adrian, M. (2002). Phytoalexins from the *Vitaceae*: Biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2731–2741. doi: 10.1021/jf011429s.
- Jeffries, T. W., Choi, S., and Kirk, T. K. (1981). Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 290–296. doi: 10.1128/aem.42.2.290-296.1981.
- Jensen, K. F. (1969). Oxygen and carbon dioxide concentrations in sound and decaying red oak trees. *For. Sci.* 15, 246–251. doi: 10.1093/forestscience/15.3.246.
- Ji, M., Li, Q., Ji, H., and Lou, H. (2014). Investigation of the distribution and season regularity of resveratrol in *Vitis amurensis* via HPLC–DAD–MS/MS. *Food Chem.* 142, 61–65. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.131.
- John, S., Wicks, T. J., Hunt, J. S., Lorimer, M. F., Oakey, H., and Scott, E. S. (2005). Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata* using *Trichoderma harzianum* and *Fusarium lateritium*. *Australas. Plant Pathol.* 34, 569. doi: 10.1071/AP05075.
- Johnston, S. R., Boddy, L., and Weightman, A. J. (2016). Bacteria in decomposing wood and their interactions with wood-decay fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, fiw179. doi: 10.1093/femsec/fiw179.
- Johnston, S. R., Hiscox, J., Savoury, M., Boddy, L., and Weightman, A. J. (2019). Highly competitive fungi manipulate bacterial communities in decomposing beech wood (*Fagus sylvatica*). *FEMS Microbiol. Ecol.* 95, 225. doi: 10.1093/femsec/fiy225.
- Kaal, E. E. J., de Jong, E., and Field, J. A. (1993). Stimulation of ligninolytic peroxidase activity by nitrogen nutrients in the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4031–4036. doi: 10.1128/aem.59.12.4031-4036.1993.
- Karlsson, M., Stenlid, J., and Olson, Å. (2007). Two hydrophobin genes from the conifer pathogen *Heterobasidion annosum* are expressed in aerial hyphae. *Mycologia* 99, 227–231. doi: 10.1080/15572536.2007.11832582.
- Karlsson, S., Holmbom, B., Spetz, P., Mustranta, A., and Buchert, J. (2001). Reactivity of *Trametes* laccases with fatty and resin acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 317–320. doi: 10.1007/s002530000532.
- Kazemi, S. M., Dickinson, D. J., and Murphy, R. J. (2001). Effects of initial moisture content on wood decay at different levels of gaseous oxygen concentrations. *J. Agric. Sci. Technol.* 3, 293–304.
- Keller, N. P., Turner, G., and Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 937–947. doi: 10.1038/nrmicro1286.

- Kirk, T. K., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K. E., and Farrell, R. L. (1986). Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme Microb. Technol.* 8, 27–32. doi: 10.1016/0141-0229(86)90006-2.
- Kirk, T. K., Tien, M., and Faison, B. D. (1984). Biochemistry of the oxidation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Adv.* 2, 183–199. doi: 10.1016/0734-9750(84)90004-1.
- Klein, O. I., Isakova, E. P., Deryabina, Y. I., Kulikova, N. A., Badun, G. A., Chernysheva, M. G., et al. (2014). Humic substances enhance growth and respiration in the basidiomycetes *Trametes maxima* under carbon limited conditions. *J. Chem. Ecol.* 40, 643–652. doi: 10.1007/s10886-014-0445-x.
- Koduri, R. S., and Tien, M. (1995). Oxidation of guaiacol by lignin peroxidase. *J. Biol. Chem.* 270, 22254–22258. doi: 10.1074/jbc.270.38.22254.
- Koman, S., and Feher, S. (2015). Basic density of hardwoods depending on age and site. *Wood Res.* 60, 907–912.
- Krah, F.-S., Bässler, C., Heibl, C., Soghigian, J., Schaefer, H., and Hibbett, D. S. (2018). Evolutionary dynamics of host specialization in wood-decay fungi. *BMC Evol. Biol.* 18, 119. doi: 10.1186/s12862-018-1229-7.
- Krain, A., and Siupka, P. (2021). Fungal guttation, a source of bioactive compounds, and its ecological role—A review. *Biomolecules* 11, 1270. doi: 10.3390/biom11091270.
- Kumari, N., and Srividhya, S. (2020). “Chapter 24: Secondary metabolites and lytic tool box of *Trichoderma* and their role in plant health,” in *Molecular aspects of plant beneficial microbes in agriculture* (Elsevier), 305–320. doi: 10.1016/B978-0-12-818469-1.00025-0.
- Kuribayashi, T., Lankinen, P., Hietala, S., and Mikkonen, K. S. (2022). Dense and continuous networks of aerial hyphae improve flexibility and shape retention of mycelium composite in the wet state. *Compos. Part Appl. Sci. Manuf.* 152, 106688. doi: 10.1016/j.compositesa.2021.106688.
- Labois, C., Wilhelm, K., Laloue, H., Tarnus, C., Bertsch, C., Goddard, M.-L., et al. (2020). Wood metabolomic responses of wild and cultivated grapevine to infection with *Neofusicoccum parvum*, a trunk disease pathogen. *Metabolites* 10, 232. doi: 10.3390/metabo10060232.
- Lambert, C., Bisson, J., Waffo-Téguo, P., Papastamoulis, Y., Richard, T., Corio-Costet, M.-F., et al. (2012). Phenolics and their antifungal role in grapevine wood decay: Focus on the *Botryosphaeriaceae* family. *J. Agric. Food Chem.* 60, 11859–11868. doi: 10.1021/jf303290g.
- Lambert, C., Richard, T., Renouf, E., Bisson, J., Waffo-Téguo, P., Bordenave, L., et al. (2013). Comparative analyses of stilbenoids in canes of major *Vitis vinifera* L. cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 61, 11392–11399. doi: 10.1021/jf403716y.
- Langcake, P. (1981). Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene. *Physiol. Plant Pathol.* 18, 213–226. doi: 10.1016/S0048-4059(81)80043-4.
- Langcake, P., and Pryce, R. J. (1977). A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* 33, 151–152. doi: 10.1007/BF02124034.
- Larignon, P., and Dubos, B. (1997). Fungi associated with esca disease in grapevine. *Eur. J. Plant Pathol.* 103, 147–157. doi: 10.1023/A:1008638409410.
- Laveau, C., Letouze, A., Louvet, G., Bastien, S., and Guérin-Dubrana, L. (2009). Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. *Phytopathol. Mediterr.* 48, 32–46. doi: https://www.jstor.org/stable/10.2307/26463329.
- Le Roy, J., Huss, B., Creach, A., Hawkins, S., and Neutelings, G. (2016). Glycosylation is a major regulator of phenylpropanoid availability and biological activity in plants. *Front. Plant Sci.* 7. doi: 10.3389/fpls.2016.00735.

- Lehmann, A., Zheng, W., Soutschek, K., Roy, J., Yurkov, A. M., and Rillig, M. C. (2019). Tradeoffs in hyphal traits determine mycelium architecture in saprobic fungi. *Sci. Rep.* 9, 14152. doi: 10.1038/s41598-019-50565-7.
- Lemaitre-Guillier, C., Fontaine, F., Roullier-Gall, C., Harir, M., Magnin-Robert, M., Clément, C., et al. (2020). Cultivar- and wood area-dependent metabolomic fingerprints of grapevine infected by *Botryosphaeria dieback*. *Phytopathology*® 110, 1821–1837. doi: 10.1094/PHYTO-02-20-0055-R.
- Levin, L., Herrmann, C., and Papinutti, V. L. (2008). Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. *Biochem. Eng. J.* 39, 207–214. doi: 10.1016/j.bej.2007.09.004.
- Li, Q., Bai, Z., O'Donnell, A., Harvey, L. M., Hoskisson, P. A., and McNeil, B. (2011). Oxidative stress in fungal fermentation processes: the roles of alternative respiration. *Biotechnol. Lett.* 33, 457–467. doi: 10.1007/s10529-010-0471-x.
- Li, Q., Harvey, L. M., and McNeil, B. (2009). Oxidative stress in industrial fungi. *Crit. Rev. Biotechnol.* 29, 199–213. doi: 10.1080/07388550903004795.
- Lieutier, F., Sauvard, D., Brignolas, F., Picron, V., Yart, A., Bastien, C., et al. (1996). Changes in phenolic metabolites of Scots-pine phloem induced by *Ophiostoma brunneo-ciliatum*, a bark-beetle-associated fungus. *For. Pathol.* 26, 145–158. doi: 10.1111/j.1439-0329.1996.tb00719.x.
- Liu, W., Feng, Y., Yu, S., Fan, Z., Li, X., Li, J., et al. (2021). The flavonoid biosynthesis network in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 12824. doi: 10.3390/ijms222312824.
- Loman, A. A. (1970). Bioassays of fungi isolated from *Pinus contorta* var. *latifolia* with pinosylvin, pinosylvinmonomethyl ether, pinobanksin, and pinocembrin. *Can. J. Bot.* 48, 1303–1308. doi: 10.1139/b70-195.
- Luque, J., Martos, S., Aroca, A., Raposo, R., and Garcia-Figueroles, F. (2009). Symptoms and fungi associated with declining mature grapevine plants in northeast Spain. *J. Plant Pathol.* 91, 381–390.
- Luque, J., Sierra, D., Torres, E., and Garcia, F. (2006). *Cryptovalsa ampelina* on grapevines in N.E. Spain: Identification and pathogenicity. *Phytopathol. Mediterr.* 45, S101–S109.
- Magnin-Robert, M., Spagnolo, A., Boulanger, A., Joyeux, C., Clément, 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. doi: 10.1094/PHYTO-09-15-0207-R.
- Mäkelä, M. R., Lundell, T., Hatakka, A., and Hildén, K. (2013). Effect of copper, nutrient nitrogen, and wood-supplement on the production of lignin-modifying enzymes by the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Fungal Biol.* 117, 62–70. doi: 10.1016/j.funbio.2012.11.006.
- Mandujano-González, V., Villa-Tanaca, L., Anducho-Reyes, M. A., and Mercado-Flores, Y. (2016). Secreted fungal aspartic proteases: A review. *Rev. Iberoam. Micol.* 33, 76–82. doi: 10.1016/j.riam.2015.10.003.
- Mansoor, K., and Lockwood, G. B. (2007). “Gas chromatography | Terpenoids,” in *Encyclopedia of Separation Science* (Manchester, UK), 1–10. Available at: www.doi.org/10.1016/B978-012226770-3/10676-4.
- Marchi, G., Peduto, F., Mugnai, L., Marco, S. D., Calzarano, F., and Surico, G. (2006). Some observations on the relationship of manifest and hidden esca to rainfall. *Phytopathol. Mediterr.* 45, S117–S126.
- Markakis, E. A., Kavroulakis, N., Ntougias, S., Koubouris, G. C., Sergentani, C. K., and Ligoxigakis, E. K. (2017). Characterization of fungi associated with wood decay of tree species and grapevine in Greece. *Plant Dis.* 101, 1929–1940. doi: 10.1094/PDIS-12-16-1761-RE.

- Markakis, E. A., Ligoxigakis, E. K., Roussos, P. A., Sergentani, C. K., Kavroulakis, N., Roidakis, E. N., et al. (2019). Differential susceptibility responses of Greek olive cultivars to *Fomitiporia mediterranea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 153, 1055–1066. doi: 10.1007/s10658-018-01622-w.
- Martens, S., and Mithöfer, A. (2005). Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry* 66, 2399–2407. doi: 10.1016/j.phytochem.2005.07.013.
- Martin, F., Delaruelle, C., and Hilbert, J.-L. (1990). An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectomycorrhizas. *Mycol. Res.* 94, 1059–1064.
- Martinez, M. J., Ruiz-Duenas, F. J., Guillen, F., and Martinez, A. T. (1996). Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* 237, 424–432. doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0424k.x.
- Martínez-Sancho, E., Slámová, L., Morganti, S., Grefen, C., Carvalho, B., Dauphin, B., et al. (2020). The GenTree Dendroecological Collection, tree-ring and wood density data from seven tree species across Europe. *Sci. Data* 7, 1. doi: 10.1038/s41597-019-0340-y.
- Masi, M., Cimmino, A., Reveglia, P., Mugnai, L., Surico, G., and Evidente, A. (2018). Advances on fungal phytotoxins and their role in grapevine trunk diseases. *J. Agric. Food Chem.* 66, 5948–5958. doi: 10.1021/acs.jafc.8b00773.
- Mazheika, I., Voronko, O., Kudryavtseva, O., Novoselova, D., Pozdnyakov, L., Mukhin, V., et al. (2020). Nitrogen-obtaining and -conserving strategies in xylotrophic basidiomycetes. *Mycologia* 112, 455–473. doi: 10.1080/00275514.2020.1716567.
- Mei, Y.-Z., Liu, R.-X., Wang, D.-P., Wang, X., and Dai, C.-C. (2015). Biocatalysis and biotransformation of resveratrol in microorganisms. *Biotechnol. Lett.* 37, 9–18. doi: 10.1007/s10529-014-1651-x.
- Mester, T., de Jong, E., and Field, J. A. (1995). Manganese regulation of veratryl alcohol in white rot fungi and its indirect effect on lignin peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1881–1887. doi: 10.1128/aem.61.5.1881-1887.1995.
- Mikiashvili, N., Elisashvili, V., Wasser, S., and Nevo, E. (2005). Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. *Biotechnol. Lett.* 27, 955–959. doi: 10.1007/s10529-005-7662-x.
- Militz, H., and Altgen, M. (2014). “Processes and properties of thermally modified wood manufactured in Europe,” in *ACS Symposium Series*, eds. T. P. Schultz, B. Goodell, and D. D. Nicholas (Washington, DC: American Chemical Society), 269–285. doi: 10.1021/bk-2014-1158.ch016.
- Miyairi, K., Fujita, K., Okuno, T., and Sawai, K. (1977). A toxic protein causative of silver-leaf disease symptoms on apple trees. *Agric. Biol. Chem.* 41, 1897–1902. doi: 10.1080/00021369.1977.10862783.
- Moiseenko, K. V., Glazunova, O. A., Shakhova, N. V., Savinova, O. S., Vasina, D. V., Tyazhelova, T. V., et al. (2019). Fungal adaptation to the advanced stages of wood decomposition: Insights from the *Steccherinum ochraceum*. *Microorganisms* 7, 527. doi: 10.3390/microorganisms7110527.
- Mondello, V., Songy, A., Battiston, E., Pinto, C., Coppin, C., Trotel-Aziz, P., et al. (2018). Grapevine trunk diseases: A review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. *Plant Dis.* 102, 1189–1217. doi: 10.1094/PDIS-08-17-1181-FE.
- Morel, M., Meux, E., Mathieu, Y., Thuillier, A., Chibani, K., Harvengt, L., et al. (2013). Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi: Fungal xenomic networks. *Microb. Biotechnol.* 6, 248–263. doi: 10.1111/1751-7915.12015.
- Moretti, S., Pacetti, A., Pierron, R., Kassemeyer, H.-H., Fischer, M., Péros, J.-P., et al. (2021). *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch., the historical Esca agent: a comprehensive review on the main grapevine wood rot agent in Europe. *Phytopathol. Mediterr.* 60, 351–379. doi: 10.36253/phyto-13021.

- Mugnai, L., Graniti, A., and Surico, G. (1999). Esca (black measles) and brown wood-streaking: Two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Dis.* 83, 404–418. doi: 10.1094/PDIS.1999.83.5.404.
- Nagy, L. G., Riley, R., Bergmann, P. J., Krizsán, K., Martin, F. M., Grigoriev, I. V., et al. (2017a). Genetic bases of fungal white rot wood decay predicted by phylogenomic analysis of correlated gene-phenotype evolution. *Mol. Biol. Evol.* 34, 35–44. doi: 10.1093/molbev/msw238.
- Nagy, L. G., Riley, R., Tritt, A., Adam, C., Daum, C., Floudas, D., et al. (2016). Comparative genomics of early-diverging mushroom-forming fungi provides insights into the origins of lignocellulose decay capabilities. *Mol. Biol. Evol.* 33, 959–970. doi: 10.1093/molbev/msv337.
- Nagy, L. G., Tóth, R., Kiss, E., Slot, J., Gácsér, A., and Kovács, G. M. (2017b). “Six key traits of fungi: Their evolutionary origins and genetic bases,” in *The Fungal Kingdom*, eds. J. Heitman, B. J. Howlett, P. W. Crous, E. H. Stukenbrock, T. Y. James, and N. A. R. Gow (Washington, DC, USA: ASM Press), 35–56. doi: 10.1128/9781555819583.ch2.
- Negrão, D. R., Mischan, M. M., de Pinho, S. Z., de Carvalho, L. R., Gomes, R. L., and de Souza Passos, J. R. (2021). How temperature variation affects white-rot fungi mycelial growth dynamics: a nonlinear mixed models approach. *Fungal Biol.* 125, 860–868. doi: 10.1016/j.funbio.2021.05.007.
- Németh, G., Hegyi, O., Dunai, A., and Kocsis, L. (2017). Stilbenes in the different organs of *Vitis vinifera* cv. Merlot grafted on Teleki Kober 5BB rootstock. *OENO One* 51, 323. doi: 10.20870/oenone.2016.50.4.1068.
- Nerg, A.-M., Heijari, J., Noldt, U., Viitanen, H., Vuorinen, M., Kainulainen, P., et al. (2004). Significance of wood terpenoids in the resistance of scots pine provenances against the old house borer, *Hylotrupes bajulus*, and brown-rot fungus, *Coniophora puteana*. *J. Chem. Ecol.* 30, 125–141. doi: 10.1023/B:JOEC.0000013186.75496.68.
- Niem, J. M., Billones-Baaijens, R., Stodart, B., and Savocchia, S. (2020). Diversity profiling of grapevine microbial endosphere and antagonistic potential of endophytic *Pseudomonas* against grapevine trunk diseases. *Front. Microbiol.* 11, 477. doi: 10.3389/fmicb.2020.00477.
- Nuopponen, M., Vuorinen, T., Jämsä, S., and Viitaniemi, P. (2003). The effects of a heat treatment on the behaviour of extractives in softwood studied by FTIR spectroscopic methods. *Wood Sci. Technol.* 37, 109–115. doi: 10.1007/s00226-003-0178-4.
- Nzokou, P., and Kamdem, D. P. (2004). Influence of wood extractives on moisture sorption and wettability of red oak (*Quercus rubra*), black cherry (*Prunus serotina*), and red pine (*Pinus resinosa*). *Wood Fiber Sci.* 36, 483–492.
- Olivon, F., Elie, N., Grelier, G., Roussi, F., Litaudon, M., and Touboul, D. (2018). MetGem software for the generation of molecular networks based on the t-SNE algorithm. *Anal. Chem.* 90, 13900–13908. doi: 10.1021/acs.analchem.8b03099.
- Ordaz, A., Favela, E., Meneses, M., Mendoza, G., and Loera, O. (2012). Hyphal morphology modification in thermal adaptation by the white-rot fungus *Fomes* sp. EUM1. *J. Basic Microbiol.* 52, 167–174. doi: 10.1002/jobm.201000528.
- Pacetti, A., Moretti, S., Perrin, C., Gelhaye, E., Bieler, E., Kassemeyer, H.-H., et al. (2022). Grapevine wood-degrading activity of *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch.: A focus on the enzymatic pathway regulation. *Front. Microbiol.* 13, 844264. doi: 10.3389/fmicb.2022.844264.
- Pacetti, A., Moretti, S., Pinto, C., Compant, S., Farine, S., Bertsch, C., et al. (2021). Trunk Surgery as a Tool to Reduce Foliar Symptoms in Diseases of the Esca Complex and Its Influence on Vine Wood Microbiota. *J. Fungi* 7, 521. doi: 10.3390/jof7070521.
- Pandey, M. K., Sarma, B. K., Singh, D. P., and Singh, U. P. (2007). Biochemical investigations of sclerotial exudates of *Sclerotium rolfsii* and their antifungal activity. *J. Phytopathol.* 155, 84–89. doi: 10.1111/j.1439-0434.2007.01194.x.

- Park, H. B., Sampathkumar, P., Perez, C. E., Lee, J. H., Tran, J., Bonanno, J. B., et al. (2017). Stilbene epoxidation and detoxification in a *Photorhabdus luminescens*-nematode symbiosis. *J. Biol. Chem.* 292, 6680–6694. doi: 10.1074/jbc.M116.762542.
- Patanita, M., Albuquerque, A., Campos, M. D., Materatski, P., Varanda, C. M. R., Ribeiro, J. A., et al. (2022). Metagenomic assessment unravels fungal microbiota associated to grapevine trunk diseases. *Horticulturae* 8, 288. doi: 10.3390/horticulturae8040288.
- Pawlus, A. D., Sahli, R., Bisson, J., Rivièrè, C., Delaunay, J.-C., Richard, T., et al. (2013). Stilbenoid profiles of canes from *Vitis* and *Muscadinia* species. *J. Agric. Food Chem.* 61, 501–511. doi: 10.1021/jf303843z.
- Perez-Gonzalez, G., Sebestyen, D., Petit, E., Jellison, J., Mugnai, L., Gelhaye, E., et al. (2022). Oxygen radical-generating metabolites secreted by *Eutypa* and *Esca* fungal consortia: Understanding the mechanisms behind grapevine wood deterioration and pathogenesis. *Front. Plant Sci.* 13, Article 921961. doi: 10.3389/fpls.2022.921961.
- Périé, F. H., and Gold, M. H. (1991). Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2240–2245. doi: 10.1128/aem.57.8.2240-2245.1991.
- Péros, J.-P., Jamaux-DesprÉAux, I., Berger, G., and Gerba, D. (1999). The potential importance of diversity in *Eutypa lata* and co-colonising fungi in explaining variation in development of grapevine dieback. *Mycol. Res.* 103, 1385–1390. doi: 10.1017/S0953756299008291.
- Perrot, T., Salzet, G., Amusant, N., Beauchene, J., Gérardin, P., Dumarçay, S., et al. (2020). A reverse chemical ecology approach to explore wood natural durability. *Microb. Biotechnol.* 14, 317. doi: 10.1111/1751-7915.13540.
- Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., and Richter, H. (2004). Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis* 43, 145–148.
- Pinto, M. del C., García-Barrado, J. A., and Macías, P. (2003). Oxidation of resveratrol catalyzed by soybean lipoxygenase. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1653–1657. doi: 10.1021/jf025818d.
- Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., Pezzella, C., Sannia, G., and Faraco, V. (2011). Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Curr. Genomics* 12, 104–112. doi: 10.2174/138920211795564331.
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., and Orešič, M. (2010). MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 11, 395. doi: 10.1186/1471-2105-11-395.
- Pollastro, S., Dongiovanni, C., Abbatecola, A., and Guido, M. A. D. (2001). Specific SCAR primers for fungi associated with wood decay of grapevine. *Phytopathol. Mediterr.* 40, Supplement, S362–S368.
- Ponzoni, C., Beneventi, E., Cramarossa, M. R., Raimondi, S., Trevisi, G., Pagnoni, U. M., et al. (2007). Laccase-catalyzed dimerization of hydroxystilbenes. *Adv. Synth. Catal.* 349, 1497–1506. doi: 10.1002/adsc.200700043.
- Popper, R., Niemz, P., and Eberle, G. (2005). Untersuchungen zum sorptions- und quellungsverhalten von thermisch behandeltem holz. *Holz Als Roh- Werkst.* 63, 135–148. doi: 10.1007/s00107-004-0554-2.
- Privat, C., Telo, J. P., Bernardes-Genisson, V., Vieira, A., Souchard, J.-P., and Nepveu, F. (2002). Antioxidant properties of *trans*- ϵ -viniferin as compared to stilbene derivatives in aqueous and nonaqueous media. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1213–1217. doi: 10.1021/jf010676t.
- Purahong, W., Wubet, T., Lentendu, G., Hoppe, B., Jariyavidyanont, K., Arnstadt, T., et al. (2018). Determinants of deadwood-inhabiting fungal communities in temperate forests: Molecular evidence from a large scale deadwood decomposition experiment. *Front. Microbiol.* 9, Article 2120. doi: 10.3389/fmicb.2018.02120.

- Püssa, T., Floren, J., Kuldkepp, P., and Raal, A. (2006). Survey of grapevine *Vitis vinifera* stem polyphenols by liquid chromatography–diode array detection–tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7488–7494. doi: 10.1021/jf061155e.
- Quarantin, A., Haderer, B., Kröger, C., Schäfer, W., Favaron, F., Sella, L., et al. (2019). Different hydrophobins of *Fusarium graminearum* are involved in hyphal growth, attachment, water-air interface penetration and plant infection. *Front. Microbiol.* 10, 751. doi: 10.3389/fmicb.2019.00751.
- Ran, B., Huang, S., and Henriksson, G. (2016). Isolation of exceedingly low oxygen consuming fungal strains able to utilize lignin as carbon source. *Cellul. Chem. Technol.* 50, 811–817.
- Reina, R., Kellner, H., Hess, J., Jehmlich, N., García-Romera, I., Aranda, E., et al. (2019). Genome and secretome of *Chondrostereum purpureum* correspond to saprotrophic and phytopathogenic life styles. *PLoS ONE* 14, e0212769. doi: 10.1371/journal.pone.0212769.
- Reniero, F., Rudolph, M., Angioniz, A., Bernreuther, A., Cabras, P., and Mattivi, F. (1996). Identification of two stilbenoids from *Vitis* roots. *Vitis* 35, 125–127.
- Ribera, J., Panzarasa, G., Stobbe, A., Osypova, A., Rupper, P., Klose, D., et al. (2019). Scalable biosynthesis of melanin by the basidiomycete *Armillaria cepistipes*. *J. Agric. Food Chem.* 67, 132–139. doi: 10.1021/acs.jafc.8b05071.
- Riley, R., Salamov, A. A., Brown, D. W., Nagy, L. G., Floudas, D., Held, B. W., et al. (2014). Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 9923–9928. doi: 10.1073/pnas.1400592111.
- Rira, M. (2019). Les tanins hydrolysables et condensés: une piste pour la réduction de la production du méthane entérique par les ruminants en milieu tropical. [Thèse de Doctorat]. [Clermont-Ferrand, FR] : Université de Clermont Auvergne.
- Rivière, C., Pawlus, A. D., and Mérillon, J.-M. (2012). Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in *Vitaceae*. *Nat. Prod. Rep.* 29, 1317. doi: 10.1039/c2np20049j.
- Roffael, E. (2016). Significance of wood extractives for wood bonding. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 1589–1596. doi: 10.1007/s00253-015-7207-8.
- Roll-Hansen, F., and Roll-Hansen, H. (1980). Microorganisms which invade *Picea abies* in seasonal stem wounds: II. Ascomycetes, fungi imperfecti, and bacteria. General discussion, Hymenomycetes included. *For. Pathol.* 10, 396–410. doi: 10.1111/j.1439-0329.1980.tb00057.x.
- Roupe, K., Remsberg, C., Yanez, J., and Davies, N. (2006). Pharmacometrics of stilbenes: Seguing towards the clinic. *Curr. Clin. Pharmacol.* 1, 81–101. doi: 10.2174/157488406775268246.
- Rowe, J. W. ed. (1989). *Natural Products of Woody Plants*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg doi: 10.1007/978-3-642-74075-6.
- Rusjan, D., Persic, M., Likar, M., Biniari, K., and Mikulic-Petkovsek, M. (2017). Phenolic responses to Esca-associated fungi in differently decayed grapevine woods from different trunk parts of ‘Cabernet Sauvignon.’ *J. Agric. Food Chem.* 65, 6615–6624. doi: 10.1021/acs.jafc.7b02188.
- Sakalidis, M. L., Hardy, G. E. StJ., and Burgess, T. I. (2011). Class III endophytes, clandestine movement amongst hosts and habitats and their potential for disease; a focus on *Neofusicoccum australe*. *Australas. Plant Pathol.* 40, 510–521. doi: 10.1007/s13313-011-0077-3.
- Scharf, D. H., Heinekamp, T., and Brakhage, A. A. (2014). Human and plant fungal pathogens: The role of secondary metabolites. *PLoS Pathog.* 10, e1003859. doi: 10.1371/journal.ppat.1003859.
- Scheffer, T. C. (1966). Natural resistance of wood to microbial deterioration. *Annu. Rev. Phytopathol.* 4, 147–168. doi: 10.1146/annurev.py.04.090166.001051.

- Schilling, M., Farine, S., Péros, J.-P., Bertsch, C., and Gelhaye, E. (2021). “Wood degradation in grapevine diseases,” in *Wood Degradation and Lignolytic Fungi Advances in Botanical Research (ABR)*, Chapter 6. Available at: <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2021.05.007>.
- Schilling, M., Maia-Grondard, A., Baltenweck, R., Robert, E., Hugueney, P., Bertsch, C., et al. (2022). Wood degradation by *Fomitiporia mediterranea* M. Fischer: Physiologic, metabolomic and proteomic approaches. *Front. Plant Sci.* 13, 988709. doi: 10.3389/fpls.2022.988709.
- Schmieder, S. S., Stanley, C. E., Rzepiela, A., van Swaay, D., Sabotič, J., Nørrelykke, S. F., et al. (2019). Bidirectional propagation of signals and nutrients in fungal networks via specialized hyphae. *Curr. Biol.* 29, 217–228.e4. doi: 10.1016/j.cub.2018.11.058.
- Schubert, M., Mourad, S., and Schwarze, F. (2010). Radial basis function neural networks for modeling growth rates of the basidiomycetes *Physisporinus vitreus* and *Neolentinus lepideus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 703–712. doi: 10.1007/s00253-009-2185-3.
- Schueffler, A., and Anke, T. (2014). Fungal natural products in research and development. *Nat Prod Rep* 31, 1425–1448. doi: 10.1039/C4NP00060A.
- Schultz, T. P., Boldin, W. D., Fisher, T. H., Nicholas, D. D., McMurtrey, K. D., and Pobanz, K. (1992). Structure-fungicidal properties of some 3- and 4-hydroxylated stilbenes and bibenzyl analogues. *Phytochemistry* 31, 3801–3806. doi: 10.1016/S0031-9422(00)97531-9.
- Schultz, T. P., Harms, W. B., Fisher, T. H., McMurtrey, K. D., Minn, J., and Nicholas, D. D. (1995). Durability of angiosperm heartwood: The importance of extractives. *hfs* 49, 29–34. doi: 10.1515/hfs.1995.49.1.29.
- Schwarze, F. W. M. R. (2007). Wood decay under the microscope. *Fungal Biol. Rev.* 21, 133–170. doi: 10.1016/j.fbr.2007.09.001.
- Sebestyén, D., Perez-Gonzalez, G., and Goodell, B. (2022). Antioxidants and iron chelators inhibit oxygen radical generation in fungal cultures of plant pathogenic fungi. *Fungal Biol.* 126, 480–487. doi: 10.1016/j.funbio.2022.04.002.
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., and Zheng, B. (2019). Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules* 24, 2452. doi: 10.3390/molecules24132452.
- Shimoda, K., Kubota, N., Uesugi, D., Kobayashi, Y., Hamada, H., and Hamada, H. (2020). Glycosylation of stilbene compounds by cultured plant cells. *Molecules* 25, 1437. doi: 10.3390/molecules25061437.
- Silva-Valderrama, I., Toapanta, D., Miccono, M. de los A., Lolas, M., Díaz, G. A., Cantu, D., et al. (2021). Biocontrol potential of grapevine endophytic and rhizospheric fungi against trunk pathogens. *Front. Microbiol.* 11, 614620. doi: 10.3389/fmicb.2020.614620.
- Singh, D., and Chen, S. (2008). The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 399–417. doi: 10.1007/s00253-008-1706-9.
- Šnajdr, J., and Baldrian, P. (2007). Temperature affects the production, activity and stability of ligninolytic enzymes in *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*. *Folia Microbiol. (Praha)* 52, 498–502. doi: 10.1007/BF02932110.
- Sobolev, V. S., Khan, S. I., Tabanca, N., Wedge, D. E., Manly, S. P., Cutler, S. J., et al. (2011). Biological activity of peanut (*Arachis hypogaea*) phytoalexins and selected natural and synthetic stilbenoids. *J. Agric. Food Chem.* 59, 1673–1682. doi: 10.1021/jf104742n.
- Sorz, J., and Hietz, P. (2008). Is oxygen involved in beech (*Fagus sylvatica*) red heartwood formation? *Trees* 22, 175–185. doi: 10.1007/s00468-007-0187-2.
- Soural, I., Vrchotová, N., Tríska, J., Balík, J., Horník, Š., Cuřínová, P., et al. (2015). Various extraction methods for obtaining stilbenes from grape cane of *Vitis vinifera* L. *Molecules* 20, 6093–6112. doi: 10.3390/molecules20046093.

- Spagnolo, A., Larignon, P., Magnin-Robert, M., Hovasse, A., Cilindre, C., Van Dorselaer, 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. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 9644–9669. doi: 10.3390/ijms15069644.
- Sparapano, L., Bruno, G., Ciccarone, C., and Graniti, A. (2000). Infection of grapevines by some fungi associated with Esca. II. Interaction among *Phaeoacremonium chlamydosporum*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. *Phytopathol. Mediterr.* 39, 53–58.
- Sparapano, L., Bruno, G., and Graniti, A. (2001). Three-year observation of grapevines cross-inoculated with esca-associated fungi. *Phytopathol. Mediterr.* 40, S376–S386. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-1643.
- Speranza, M., Gutiérrez, A., del Río, J. C., Bettucci, L., Martínez, Á. T., and Martínez, M. J. (2009). Sterols and lignin in *Eucalyptus globulus* Labill. wood: Spatial distribution and fungal removal as revealed by microscopy and chemical analyses. *Holzforschung* 63. doi: 10.1515/HF.2009.041.
- Stempien, E., Goddard, M.-L., Wilhelm, K., Tarnus, C., Bertsch, C., and Chong, J. (2017). Grapevine Botryosphaeria dieback fungi have specific aggressiveness factor repertory involved in wood decay and stilbene metabolization. *PLOS ONE* 12, e0188766. doi: 10.1371/journal.pone.0188766.
- Strunz, G. M., Bethell, R., Dumas, M. T., and Boyonoski, N. (1997). On a new synthesis of sterpurene and the bioactivity of some related *Chondrostereum purpureum* sesquiterpene metabolites. *Can. J. Chem.* 75, 742–753. doi: 10.1139/v97-090.
- Surico, G., Marchi, G., Braccini, P., and Mugnai, L. (2000). Epidemiology of esca in some vineyards in Tuscany (Italy). *Phytopathol. Mediterr.* 39, 16.
- Suzuki, S. U., and Sasaki, A. (2019). Ecological and evolutionary stabilities of biotrophism, necrotrophism, and saprotrophism. *Am. Nat.* 194, 90–103. doi: 10.1086/703485.
- Tabacchi, R., Fkyerat, A., Poliart, C., and Dubin, G.-M. (2000). Phytotoxins from fungi of esca of grapevine. *Phytopathol. Mediterr.* 39, 6.
- Tao, Y., Chen, R., Yan, J., Long, Y., Tong, Z., Song, H., et al. (2019). A hydrophobin gene, Hyd9, plays an important role in the formation of aerial hyphae and primordia in *Flammulina filiformis*. *Gene* 706, 84–90. doi: 10.1016/j.gene.2019.04.067.
- Tarasov, D., Leitch, M., and Fatehi, P. (2018). Lignin–carbohydrate complexes: properties, applications, analyses, and methods of extraction: A review. *Biotechnol. Biofuels* 11. doi: 10.1186/s13068-018-1262-1.
- Teixeira, A. R. (1960). Characteristics of the generative hyphae of polypores of North America, with special reference to the presence or absence of clamp-connections. *Mycologia* 52, 30–39. doi: 10.1080/00275514.1960.12024877.
- ten Have, R., and Teunissen, P. J. M. (2001). Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white-rot fungi. *Chem. Rev.* 101, 3397–3414. doi: 10.1021/cr000115l.
- Tey-Rulh, P., Philippe, I., Renaud, J.-M., Tsoupras, G., de Angelis, P., Fallot, J., et al. (1991). Eutypine, a phytotoxin produced by *Eutypa lata* the causal agent of dying-arm disease of grapevine. *Phytochemistry* 30, 471–473. doi: 10.1016/0031-9422(91)83707-R.
- Tian, B., and Liu, J. (2020). Resveratrol: a review of plant sources, synthesis, stability, modification and food application. *J. Sci. Food Agric.* 100, 1392–1404. doi: 10.1002/jsfa.10152.
- Tian, J.-H., Pourcher, A.-M., Bouchez, T., Gelhaye, E., and Peu, P. (2014). Occurrence of lignin degradation genotypes and phenotypes among prokaryotes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 9527–9544. doi: 10.1007/s00253-014-6142-4.
- Tien, M., and Kirk, T. K. (1983). Lignin-degrading enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. *Science* 221, 661–663. doi: 10.1126/science.221.4611.661.

- Tišma, M., Žnidaršič-Plazl, P., Šelo, G., Tolj, I., Šperanda, M., Bucić-Kojić, A., et al. (2021). *Trametes versicolor* in lignocellulose-based bioeconomy: State of the art, challenges and opportunities. *Bioresour. Technol.* 330, 124997. doi: 10.1016/j.biortech.2021.124997.
- Tran-Ly, A. N., Reyes, C., Schwarze, F. W. M. R., and Ribera, J. (2020). Microbial production of melanin and its various applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36, 170. doi: 10.1007/s11274-020-02941-z.
- Tudor, D., Robinson, S. C., and Cooper, P. A. (2013). The influence of pH on pigment formation by lignicolous fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 80, 22–28. doi: 10.1016/j.ibiod.2012.09.013.
- Ujor, V. C., Peiris, D. G., Monti, M., Kang, A. S., Clements, M. O., and Hedger, J. N. (2012). Quantitative proteomic analysis of the response of the wood-rot fungus, *Schizophyllum commune*, to the biocontrol fungus, *Trichoderma viride*: Combative fungal interaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 54, 336–343. doi: 10.1111/j.1472-765X.2012.03215.x.
- Vahtikari, K., Rautkari, L., Noponen, T., Lillqvist, K., and Hughes, M. (2017). The influence of extractives on the sorption characteristics of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *J. Mater. Sci.* 52, 10840–10852. doi: 10.1007/s10853-017-1278-0.
- Valette, N., Perrot, T., Sormani, R., Gelhaye, E., and Morel-Rouhier, M. (2017). Antifungal activities of wood extractives. *Fungal Biol. Rev.* 31, 113–123. doi: 10.1016/j.fbr.2017.01.002.
- Valletta, A., Iozia, L. M., and Leonelli, F. (2021). Impact of environmental factors on stilbene biosynthesis. *Plants* 10, 90. doi: 10.3390/plants10010090.
- Van Soest, P. J., and McQueen, R. W. (1973). The chemistry and estimation of fibre. *Proc. Nutr. Soc.* 32, 123–130. doi: 10.1079/PNS19730029.
- Vek, V., Keržič, E., Poljanšek, I., Eklund, P., Humar, M., and Oven, P. (2021). Wood extractives of silver fir and their antioxidant and antifungal properties. *Molecules* 26, 6412. doi: 10.3390/molecules26216412.
- Venäläinen, M., Velling, P., Harju, A. M., Saranpää, P., Kainulainen, P., and Tiitta, M. (2004). The concentration of phenolics in brown-rot decay resistant and susceptible Scots pine heartwood. *Wood Sci. Technol.* 38, 109–118. doi: 10.1007/s00226-004-0226-8.
- Veneault-Fourrey, C., and Martin, F. (2011). Mutualistic interactions on a knife-edge between saprotrophy and pathogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 444–450. doi: 10.1016/j.pbi.2011.03.022.
- Vergara, C., Damm, A., Macke, S., Gorena, T., and Winterhalter, P. (2012). Stilbene levels in grape cane of different cultivars in Southern Chile: Determination by HPLC-DAD-MS/MS method. *J AgricFood Chem* 60, 929–933. doi: 10.1021/jf204482c.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant* 3, 2–20. doi: 10.1093/mp/ssp106.
- Vrsanska, M., Voberkova, S., Langer, V., Palovcikova, D., Moulick, A., Adam, V., et al. (2016). Induction of laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase activities in white-rot fungi using copper complexes. *Molecules* 21, 1553. doi: 10.3390/molecules21111553.
- Waffo Tegu, P., Fauconneau, B., Deffieux, G., Huguet, F., Vercauteren, J., and Mérillon, J.-M. (1998). Isolation, identification, and antioxidant activity of three stilbene glucosides newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures. *J. Nat. Prod.* 61, 655–657. doi: 10.1021/np9704819.
- Wagschal, I., Abou-Mansour, E., Petit, A.-N., Clement, C., and Fontaine, F. (2008). “Wood diseases of grapevine: A review on *Eutypa dieback* and *Esca*,” in *Plant-Microbe Interactions* (Kerala: Research Signpost), 16.
- Wang, H., Sun, K., Guan, Y., Qiu, M., Zhang, L., and Dai, C. (2019). Fungal endophyte *Phomopsis liquidambari* biodegrades soil resveratrol: a potential allelochemical in peanut monocropping systems. *J. Sci. Food Agric.* 99, 5899–5909. doi: 10.1002/jsfa.9865.
- Wang, W., Tang, K., Yang, H.-R., Wen, P.-F., Zhang, P., Wang, H.-L., et al. (2010). Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv.

- Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 142–152. doi: 10.1016/j.plaphy.2009.12.002.
- Wilkens, A., Paulsen, J., Wray, V., and Winterhalter, P. (2010). Structures of two novel trimeric stilbenes obtained by horseradish peroxidase catalyzed biotransformation of *trans*-resveratrol and (-)- ϵ -viniferin. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6754–6761. doi: 10.1021/jf100606p.
- Willenberg, I., Brauer, W., Empl, M. T., and Schebb, N. H. (2012). Development of a rapid LC-UV method for the investigation of chemical and metabolic stability of resveratrol oligomers. *J. Agric. Food Chem.* 60, 7844–7850. doi: 10.1021/jf302136t.
- Willför, S. M., Ahotupa, M. O., Hemming, J. E., Reunanen, M. H. T., Eklund, P. C., Sjöholm, R. E., et al. (2003). Antioxidant activity of knotwood extractives and phenolic compounds of selected tree species. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7600–7606. doi: 10.1021/jf030445h.
- Worrall, J. J., Anagnost, S. E., and Zabel, R. A. (1997). Comparison of wood decay among diverse lignicolous fungi. *Mycologia* 89, 199–219.
- Wösten, H. A. B. (2001). Hydrophobins: Multipurpose proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 625–646. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.625.
- Wösten, H. A. B., van Wetter, M.-A., Lugones, L. G., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., and Wessels, J. G. H. (1999). How a fungus escapes the water to grow into the air. *Curr. Biol.* 9, 85–88. doi: 10.1016/S0960-9822(99)80019-0.
- Xu, D., Xue, M., Shen, Z., Jia, X., Hou, X., Lai, D., et al. (2021). Phytotoxic secondary metabolites from fungi. *Toxins* 13, 261. doi: 10.3390/toxins13040261.
- Yamaji, K., and Ichihara, Y. (2012). The role of catechin and epicatechin in chemical defense against damping-off fungi of current-year *Fagus crenata* seedlings in natural forest: Role of catechins in chemical defense. *For. Pathol.* 42, 1–7. doi: 10.1111/j.1439-0329.2010.00709.x.
- Yazaki, Y. (2015). Utilization of flavonoid compounds from bark and wood: A review. *Nat. Prod. Commun.* 10, 1934578X1501000. doi: 10.1177/1934578X1501000333.
- Zapata, C., Deléens, E., Chaillou, S., and Magné, C. (2004). Partitioning and mobilization of starch and N reserves in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *J. Plant Physiol.* 161, 1031–1040. doi: 10.1016/j.jplph.2003.11.009.
- Zhang, J., Silverstein, K. A. T., Castaño, J. D., Figueroa, M., and Schilling, J. S. (2019). Gene regulation shifts shed light on fungal adaption in plant biomass decomposers. *mBio* 10. doi: 10.1128/mBio.02176-19.

Annexes

Annexes

1. Annexe 1 : principaux stilbénoides identifiés dans les parties lignifiées de la vigne.

Abbreviations: nq = quantités inconnues ; mf = masse fraîche ; ms = masse sèche ; * = annotation putative basées sur le spectre MS/MS et l'interrogation de bases de données ; ** = données issues de boutures considérées comme saines (non-inoculées) mais ayant subi une blessure (trou) 2 mois avant le prélèvement ayant entraîné une nécrose de taille négligeable;*** = données issues de bois visuellement sain mais prélevé sur un cep symptomatique de l'Esca, duquel les parties nécrotiques ont été séparées ; Réf. = Références : 1 (Németh et al., 2017) ; 2 (Bavaresco and Fregoni, 2001) ; 3 (Labois et al., 2020) ; 4 (Bavaresco et al., 2003) ; 5 (Bavaresco et al., 2000) ; 6 (Reniero et al., 1996) ; 7 (Lambert et al., 2013) ; 8 (Wang et al., 2010) ; 9 (Ji et al., 2014) ; 10 (Chervin et al., 2022) ; 11 (Rusjan et al., 2017) ; 12 (Püssa et al., 2006) ; 13 (Lambert et al., 2012) ; 14 (Amalfitano et al., 2011) ; 15 (Magnin-Robert et al., 2016) ; 16 (Guerrero, 2016) ; 17 (Vergara et al., 2012) ; 18 (Pawlus et al., 2013) ; 19 (Gabaston et al., 2019)

Organe ou origine	Espèce/cultivar	stilbénoides	Réf.
Graines	V. sp.	<i>trans</i> - et <i>cis</i> -resvératrol (resp. 1 à 62 et 8mg/kg mf)	2
	V. vinifera 'Merlot'	<i>trans</i> -resvératrol (0.78 ^{+/-0.02} mg/kg ms), <i>epsilon</i> -viniférine (2.37 ^{+/-0.38} mg/kg ms)	1
Rafle	V. sp.	<i>trans</i> - et <i>cis</i> -resvératrol (resp. 30 à 802 et 0.10 à 0.59mg/kg mf), <i>epsilon</i> -viniférine (30 à 170mg/kg mf), autres oligostilbènes	2
	V. vinifera	<i>trans</i> -resvératrol (17.43 ^{+/-2.43} à 113mg/kg ms), <i>epsilon</i> -viniférine (98.51 ^{+/-6.13} à 288mg/kg ms)	1
Bourgeons	V. vinifera 'Merlot'	<i>epsilon</i> -viniférine (2081 ^{+/-170} mg/kg ms)	1
Apex de la tige lignifiée (plants de 1 an)	V. vinifera (divers cv.)	resvératrol (1.1 à 3.2 mg/g ms), <i>epsilon</i> -viniférine (0.7 à 1.7 mg/g ms), 1 trimère de resvératrol majoritaire (0.04 à 0.24 mg/g ms), 3 glycosides de resvératrol (dont <i>trans</i> -picéide) (nq), picéatannol (nq), picéatannol O-glucoside(nq), 5 dimères de resvératrol (hors <i>epsilon</i> -viniférine) (nq), 1 glycoside de dimère de resvératrol, 2 trimères de resvératrol (hors trimère majoritaire), 3 tétramères de resvératrol	12
Bouture (entre-nœud)	V. vinifera 'Cabernet-Sauvignon'	Oxyresvératrol (nq), ptérostilbène (nq), <i>epsilon</i> -viniférine (nq), <i>alpha</i> -viniférine (nq), 1-(3,5-Dihydroxyphenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)ethane 4'-O-O-β-D-glucopyranoside* (nq), leachianol F (nq), ampelopsine D (nq), suffruticosol A (nq), diptoindonésine B (nq), <i>cis</i> -miyabenol C (nq)	10
Bouture (entre-nœud)**	V. vinifera 'Merlot'	<i>trans</i> -picéide (39 ^{+/-10} μg/g mf), <i>trans</i> -picéatannol (64 ^{+/-35} μg/g mf), <i>trans</i> -resvératrol (104 ^{+/-49} μg/g mf), ampelopsin A (64 ^{+/-43} μg/g mf), hopéaphénol (1147 ^{+/-460} μg/g mf), isohopéaphénol (876 ^{+/-387} μg/g mf), miyabénol C (202 ^{+/-81} μg/g mf), <i>epsilon</i> -viniférine (649 ^{+/-233} μg/g mf)	13
Sarments	V. sp.	<i>trans</i> -resvératrol (23 à 700mg/kg mf), <i>epsilon</i> -viniférine (500mg/kg mf)	2

	<i>V. vinifera</i> (divers cv.)	Hopéaphénol (0,1 à 1,7g/kg ms), ampelopsin A (tr. à 2,2g/kg ms), ampélopsine F (tr. A 0,4g/kg ms), ampelopsin H (tr. A 0,6g/kg ms), ampélopsine E (tr. A 0,2g/kg ms), pallidol (0,1 à 0,8g/kg ms), isohopéaphénol (tr. à 4,8g/kg ms), picéatannol (72 à 3737 mg/kg ms), <i>trans</i> -picéide (tr. à 0,3g/kg ms), <i>trans</i> -resvératrol (190mg à 4,4g/kg ms), miyabenol C (nq à 0,7 g/kg ms), <i>epsilon</i> -viniférine (75mg à 7,7 g/kg ms), <i>r</i> -viniferin (= vitisin B (nq à 1116 mg/kg ms), (jusqu'à 791.29mg/kg ms)), <i>omega</i> -viniférine (tr. à 1,4g/kg ms), vitisin A (tr. à 0,8g/kg ms), vitisin B (0,1 à 3,3g/kg ms), vitisin C (tr. à 0,3g/kg ms), <i>epsilon</i> -vitisin B (2159.0 ^{+/-80.5} mg/kg ms), <i>trans</i> -amurensin B, <i>trans</i> -picéatannol (0,1 à 0,7g/kg ms), parthenocissin A (tr. A 0,4g/kg ms), viniferol E (tr. A 1,5g/kg ms)	3, 7, 16, 17, 18, 19
	<i>V. vinifera</i> 'Merlot'	<i>trans</i> -picéide (125.9 ^{+/-10.5} mg/kg ms), <i>trans</i> -resvératrol (344.5 ^{+/-32.2} mg/kg ms), <i>epsilon</i> -viniférine (385.1 ^{+/-33.4} mg/kg ms)	1
	<i>V. vinifera</i> 'Chardonnay'	<i>trans</i> -resvératrol (0.04 ^{+/-0.02} mg/g mf), <i>trans</i> -picéide (0.13 ^{+/-0.03} mg/g mf), <i>trans-epsilon</i> -viniférine (0.17 ^{+/-0.08} mg/g mf), <i>trans</i> -vitisin A (0.02 ^{+/-0.01} mg/g mf)	15
Tronc	<i>V. vinifera</i> 'Cabernet-Sauvignon'	Glycosides de resvératrol (131 à 152µg/kg mf), astringine (1.58 à 3.11µg/kg mf), glycoside d' <i>epsilon</i> -viniférine (3.33 à 9.78µg/kg mf)	11
	<i>V. vinifera</i> 'Chardonnay'	<i>trans</i> -resvératrol (0.004 ^{+/-0.002} mg/g mf), <i>trans</i> -picéide (0.04 ^{+/-0.02} mg/g mf), <i>trans-epsilon</i> -viniférine (0.06 ^{+/-0.03} mg/g mf), <i>trans</i> -vitisin A (0.008 ^{+/-0.008} mg/g mf)	15
Tronc***	<i>V. vinifera</i> 'Sangiovese'	resvératrol (0.78 mg/g ms), <i>epsilon</i> -viniférine (2.5 mg/g ms), leachianol F+G (0.35 mg/g ms), pallidol (0.41 mg/g ms), ampelopsin A (0.12 mg/g ms), <i>alpha</i> -viniférine (4.7 mg/g ms), hopéaphénol (<0.18 mg/g ms), isohopéaphénol (1.5 mg/g ms), amélopsin H (1.1 mg/g ms)	14
Racines	<i>V. sp.</i> (diverses espèces et porte-greffes)	<i>trans</i> -resvératrol (150 à 1200mg/kg mf ou 0,2 à 3,2g/kg ms), <i>epsilon</i> -viniférine (720 à 2270 mg/kg mf ou 0,5 à 8,9 g/kg ms), ampélopsine A (0,4 à 16g/kg mf), hopéaphénol (500 à 8 ^E 3mg/kg mf), picéide (0,1 à 0,6g/kg ms), gnetin H, <i>r</i> -viniférine, <i>r</i> -2-viniférine, ampélopsine F (0,1 à 0,3g/kg ms), pallidol (0,1 à 0,7g/kg ms), parthenocissin A (0,2 à 0,6g/kg ms), viniférol E (0,1 à 1,8g/kg ms), isohopéaphénol (0,2 à 4,6g/kg ms), ampélopsine H (0,1 à 0,5g/kg ms), miyabénol C (tr. à 0,4g/kg ms), <i>omega</i> -viniférine (0,1 à 6,0g/kg ms),	2, 6, 19

Annexes

		ampélopsine E (tr. à 1,6g/kg ms), vitisin A (0,4 à 7,0g/kg ms), vitisin B (3,0 à 24,3g/kg ms), vitisin C (0,2 à 1,0g/kg ms)	
	<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i> TK5BB.	<i>Trans</i> -resvératrol (113.0 ^{+/-6.2} mg/kg ms et 15.5 à 680 mg/kg mf), <i>epsilon</i> -viniférine (1476 ^{+/-181} mg/kg ms et 980 mg/kg mf), <i>trans</i> -picéide (32.2 mg/kg mf)	1, 4, 5
	<i>V. vinifera</i> 'Cabernet-Sauvignon' (en pot)	<i>trans</i> -resvératrol (4.8 mg/kg ms)	8
	<i>V. amurensis</i>	<i>trans</i> -resvératrol (61.2 – 123.4 mg/kg ms)	9

2. Annexe 2 : principaux extractibles identifiés dans les bois de forêt et principaux extractibles (hors stilbénoides) identifiés dans les parties lignifiées de la vigne.

Abbréviations: m/m = rapport en masse sèche ; mf = masse fraîche ; * = annotation putative basées sur le spectre MS/MS et l'interrogation de bases de données ; Réf. = Références : 1 (Hovelstad et al., 2006), 2 (Venäläinen et al., 2004), 3 (Harju et al., 2003), 4 (Vek et al., 2021), 5 (Labois et al., 2020) ; 6 (Chervin et al., 2022) ; 7 (Rusjan et al., 2017) ; 8 (Yamaji and Ichihara, 2012) ; 9 (Püssa et al., 2006) ; 10 (Willför et al., 2003) ; 11 (Füchtner et al., 2020) ; 12 (Speranza et al., 2009) ; 13 (da Silva et al., 2009)

Espèce	Tissu	extractibles	Réf.
Résineux			
<i>Abies alba</i> (Slovénie)	Aubier/bois de cœur/ nœuds /rameaux	Flavonoïdes (epicatechin, taxifolin, quercetin), lignanes (isolariciresinol : 29.8 à 37.6mg/g, lariciresinol, secoisolariciresinol, pinoresinol, matairesinol), acides phénoliques (homovanillic acid, coumaric acid, ferulic acid)	4
<i>A. balsamea</i> et <i>A. sibirica</i>	Bois de nœud	Lignanes (secoisolaricirésinol, laricirésinol, oligolignanes), terpénoïdes (juvabiones)	10
<i>Araucaria sp.</i>	Bois de nœud	Lignanes (diméthyl pinorésinol, laricirésinol, pinorésinol, monométhyl pinorésinol, hinokirésinol, monométhyl laricirésinol, diméthyl laricirésinol)	10
<i>Larix decidua</i>	Bois de nœud	Flavonoïdes (dont taxifoline, dihydrokaempferol), lignanes (sécoisolaricirésinol, laricirésinol, isolaricirésinol, oligolignanes)	10
	Bois de cœur	Flavonoïdes (10 à 36 mg/g, dont taxifoline, dihydrokaempferol), acides résiniques (4.6 à 7.3 mg/g, dont acides lévopimarique, communique, isopimarique, palustrique, déhydroabiétique, abiétique, néoabiétique), acides gras (0.86 à 1.1 mg/g, dont acides palmitique, margarique, pinoléique, linoléique, oléique, sciadonique), stéroïdes (0.14 à 0.18 mg/g, dont campésterol, sitostérol, cycloartenol)	11
<i>Larix gmelinii</i> var. <i>japonica</i>	Bois de cœur	Flavonoïdes (0.49 à 35.73 mg/g, dont naringénine, taxifoline (1 et 2), dihydrokaempferol), lignanes (traces à 1mg/g, dont isoliovil, dihydroxymatairesinol), acides résiniques (0.47 à 1.38mg/g, dont acides lévopimarique, communique, isopimarique, palustrique, déhydroabiétique, abiétique, néoabiétique), acides gras (0.63 à 3.2 mg/g, dont acides palmitique, margarique, pinoléique, linoléique, oléique, sciadonique), terpénoïdes (0.07 à	11

		0.75 mg/g, dont thunbergol, manool, palustral, pimarol, néoabietol, cédrol), stérois (0.05 à 0.14 mg/g, dont campestérol, sitostérol, cycloarténol)	
<i>Picea abies</i>	Bois/ Bois de nœud	Flavonoïdes (naringénine, taxifoline, dihydrokaempferol), lignanes (traces à 15mg/g /6.5% m/m, dont hydroxymatairesinol (84%), secoisolariciresinol, <i>alpha</i> -conidendrine, liovil, lignan A, pinorésinol, nortrachelogenine, lignan B, matairésinol, iso-hydroxymatairésinol, 7r-todolactol, iso-laricirésinol, laricirésinol, todolactol A, acide <i>alpha</i> -conidendrique, oligolignanes), acides résiniques (<0.2/<0.04% m/m, dont acides lévopimarique, pimarique, sandarapimarique, isopimarique, palustrique, déhydroabiétique, abiétique), acides gras (0.20 à 3.4 mg/g, dont acides palmitique, margarique, pinoléique, linoléique, oléique, alcool behenylque, linocérylique), terpénoïdes (thunbergol, néoabienol, palustral, palustrol), stérois (0.26 à 0.33mg/g, dont campestérol, sitostérol, sitostanol),	1, 10, 11
<i>Pinus cembra</i>	Bois de noeud	Stilbénoïdes (pinosylvines, éther monométhylque de pinosylvine, éther monométhylque de dihydropinosylvine)	10
<i>P. contorta</i>	Bois de noeud	Flavonoïdes (dont pinocembrine, pinobanksine), lignanes (nortrachelogénine, liovil), stilbénoïdes (pinosylvine, éther monométhylque de pinosylvine, éther monométhylque de pinosylvine, éther monométhylque de dihydropinosylvine)	10
<i>P. sibirica</i>	Bois de noeud	Flavonoïdes (dont pinocembrine), lignanes (laricirésinol, isolaricirésinol, sécoisolaricirésinol), oligolignanes, stilbénoïdes (pinosylvine, dihydropinosylvine)	10
<i>P. sylvestris</i> (Norvège)	Bois de cœur	Acides résiniques (5-10% m/m / 13.76 – 24.22mg/cm ³), stilbénoïdes (pynosylvine et dérivés - 0.2-2% m/m / 1.78-2.07mg/cm ³)	1, 2, 3
<i>P. sylvestris</i> (Norvège)	Bois de nœud	Acides résiniques (5-10% m/m), stilbénoïdes (pynosylvine et dérivés (2-8% m/m)	1, 2
<i>P. sylvestris</i> (Norvège)	Aubier	Acides résiniques (1-4% m/m)	1
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Bois de noeud	Flavonoïdes (dont taxifoline), lignanes (nortrachélogénine, isolaricirésinol, laricirésinol), terpénoïdes (juvabiones)	10
<i>Thuja occidentalis</i>	Bois de noeuds	Lignanes (matairésinol, lignan A, plusieurs non-identifiés probablement dérivés de thujaplicine et 4-O-diméthylatéine)	10

Feuillus			
<i>Quercus</i> sp.	Bois	Flavonoïdes (catéchine), acides phénoliques et dérivés (acide vanillique, syringaldehyde), tannins (ellagitanins, acide ellagique)	13
<i>Fagus crenata</i>	Plantules	Flavonoïdes (catéchine (<0.5 à 2.66 mg/g mf), épicatechine (<0.3 à 1 mg/g mf))	8
<i>Eucalyptus globulus</i>	Bois	Acides gras (palmitique, linoléique, oléique et stéarique, triglycérides), stéroïdes (squalène, sitostérol, esters et dérivés de stérols)	12
Vigne			
<i>V. vinifera</i> (France)	Entre-noeud	Flavonoïdes (épicatechine, épicatechine-3- <i>O</i> -gallate, procyanidine A*, 7- <i>O</i> -[3,4-dihydroxy-E-cinnamoyl-(\rightarrow 4)- β -D-glucuronopyranoside] apigenin 7-glycoside*, 3'- <i>O</i> -(3,4,5-trihydroxybenzoyl)-3,34,44,5,54,7-hexahydroxyflavan-(2 \rightarrow 7,4 \rightarrow 8)-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavane*, stilbénoïdes (voir Annexe 1)	5, 6
	Tronc, tête, porte-greffe	Flavonoïdes (flavanols dont catéchine – 119 à 1890 μ g/kg mf, épicatechine 19.9 à 436 μ g/kg mf, et épicatechine gallate – 112 à 1156 μ g/kg mf ; dimères, trimères et tétramères de procyanidines*), acides phénoliques (acide gallique - 14.5 à 36.6 μ g/kg mf), stilbénoïdes (voir Annexe 1)	7
<i>V. vinifera</i> (divers cultivars) (Estonie)	Apex de la tige lignifiée	Flavonoïdes (catéchine - 0.6 à 1.0 mg/g ms, épicatechine - 0.6 à 1.0 mg/g ms, <i>O</i> -glycoside d'acide caféique, procyanidines B1 et B2, <i>O</i> -glycoside de taxifoline, <i>O</i> -glycoside de quercétine, catéchine gallate), acides phénoliques (<i>O</i> -glycoside d'acide coumarique), stilbénoïdes (voir Annexe 1)	9

3. Annexe 3 : revue détaillée sur le principal agent fongique associé à l'Esca en Europe :
Fomitiporia mediterranea M. Fisch. (Publication n°4)

Publication n°4 : Moretti, S., Pacetti, A., Pierron, R., Kassemeyer, H.-H., Fischer, M., Péros, J.-P., et al. (2021). *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch., the historical Esca agent: a comprehensive review on the main grapevine wood rot agent in Europe. *Phytopathol. Mediterr.* 60, 351–379. doi: 10.36253/phyto-13021.



Citation: Author (2021) Title. *Phytopathologia Mediterranea* 60(2): 351-379. doi: 10.36253/phyto-13021

Accepted: August 12, 2021

Published: September 13, 2021

Copyright: ©2021 Author. This is an open access, peer-reviewed article published by Firenze University Press (<http://www.fupress.com/pm>) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, 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 paper and its Supporting Information files.

Competing Interests: The Author(s) declare(s) no conflict of interest.

Editor: Alan Phillips, University of Lisbon, Portugal.

Review

***Fomitiporia mediterranea* M. Fisch., the historical Esca agent: a comprehensive review on the main grapevine wood rot agent in Europe**

SAMUELE MORETTI^{1,*}, ANDREA PACETTI^{1,2}, ROMAIN PIERRON¹, HANNS-HEINZ KASSEMAYER³, MICHAEL FISCHER⁴, JEAN-PIERRE PÉROS⁵, GABRIEL PEREZ-GONZALEZ⁶, EVIE BIELER⁷, MARION SCHILLING⁸, STEFANO DI MARCO⁹, ERIC GELHAYE⁸, LAURA MUGNAI², CHRISTOPHE BERTSCH¹, SIBYLLE FARINE^{1,*}

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

² Department of Agricultural, Food, Environmental and Forestry Science and Technology (DAGRI), Plant pathology and Entomology section, University of Florence, P.le delle Cascine, 28, 50144 Firenze, Italy

³ State Institute for Viticulture, Plant Pathology & Diagnostics, Merzhauser Str. 119, 79100 Freiburg, Germany

⁴ JKI-Julius Kühn-Institute, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Plant Protection in Fruit Crops and Viticulture, D-76833 Siebeldingen, Germany

⁵ UMR AGAP Institut, Université de Montpellier, CIRAD, INRAE, Institut Agro, F-34398 Montpellier, France

⁶ Department of Microbiology, University of Massachusetts, Amherst, MA 01003, USA

⁷ University of Basel, Swiss Nanoscience Institute - Nano Imaging Lab, Basel, University of Basel, Klingelbergstrasse 50 CH-4056 Basel, Switzerland

⁸ Université de Lorraine, INRAE, IAM, F-54000 Nancy, France

⁹ Istituto per la Bioeconomia, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Gobetti 101, 40129 Bologna, Italy

*Corresponding authors: samuele.moretti@uha.fr; sibylle.farine@uha.fr

Summary. *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch. (*Fmed*) is a basidiomycete first described in 2002, and was considered up to then as part of *Fomitiporia punctata* (P. Karst) Murrill. This fungus can degrade lignocellulosic biomass, causing white rot and leaving bleached fibrous host residues. In Europe *Fmed* is considered the main grapevine wood rot (Esca) agent within the Esca disease complex, which includes some of the most economically important Grapevine Trunk Diseases (GTDs). This review summarises and evaluates published research on *Fmed*, on white rot elimination by curettage or management by treatments with specific products applied to diseased grapevines, and on the relationship between wood symptoms and Grapevine Leaf Stripe Disease (GLSD) in the Esca disease complex. Information is also reviewed on the fungus biology, mechanisms of pathogenicity, and their possible relationships with external foliar symptoms of the Esca disease complex. Information on *Fmed* control strategies is also reviewed.

Keywords. *Fmed*, Basidiomycete, white rot, wood symptoms, foliar symptoms.

INTRODUCTION

Grapevine Trunk Diseases (GTDs), mainly comprising *Botryosphaeria dieback*, *Eutypiosis* and the Esca disease complex, are widespread in vineyards (Mugnai *et al.*, 1999; Bertsch *et al.*, 2013; Bruez *et al.*, 2013; Mondello *et al.*, 2018a). These diseases significantly affect grapevine productivity causing yield losses and quality degradation affecting wine alcohol content and flavour components (Mugnai *et al.*, 1999; Lorrain *et al.*, 2012; Calzarano *et al.*, 2001, 2017).

For several decades the only effective pesticides used to control GTDs were sodium arsenite, to reduce the leaf stripe foliar symptoms in the Esca complex of diseases (Ravaz, 1919; Bonnet, 1926; Rui and Battel, 1963; Svampa and Tosatti, 1977; Del Rivero and García-Marí, 1984), and the fungicides benomyl and carbendazim, to reduce infections by the agents of *Eutypiosis* and *Botryosphaeria dieback*, respectively (Magarey and Carter 1986; Ramsdell, 1995). All these pesticides were banned in European countries in the early 2000s because of their potential environmental and/or user toxicities, more than 10 years after GTDs and especially Esca disease complex were becoming acute problems in Europe and in other grapevine growing countries. GTDs have been described as “the biotic stress of the century” for grapevines (Songy *et al.*, 2019a), and all wine-growing countries are likely to be affected by these diseases. In France, the National Grapevine Trunk Disease Survey assessed incidence and evolution of GTDs during a 10 year survey period. Up to 13% of productive vines were affected by GTDs in French vineyards (Grosman, 2008; Grosman and Doublet, 2012; Bruez *et al.*, 2013). In Italy, incidence of GTDs was between 8 to 19% (Romanazzi *et al.*, 2009), and was of average annual incidence of 12% in vineyards younger than 10 years (Abbatecola *et al.*, 2000), or up to 63% in 30 year old vineyards (Surico *et al.*, 2000).

In several countries within and outside Europe, there has been an upward trend of GTDs since the end of the 20th century (Mugnai *et al.*, 1999; Wicks and Davies, 1999; Rubio and Garzón, 2011; Úrbez-Torres *et al.*, 2014; Fontaine *et al.*, 2016a; Guérin-Dubrana *et al.*, 2019; Kraus *et al.*, 2019). GTDs have also caused severe economic losses. These have been estimated as up to \$US 260 million in California (Siebert, 2001) for GTDs, and \$US 2000 to 3000 per hectare for “Esca disease” (Vasquez 2007, in Rubio and Garzón, 2011), and approx. one billion euros in wine production due to GTDs in France (reported in 2014 by IFV, the French Wine Institute). Annual financial costs of dead vine replacements in all wine production countries were estimated to be 1.132 billion euros (Hofstetter *et al.*, 2012). These losses

have been the major reason that professional winegrowers, research agencies, financial consortia and the scientific community have concentrated on GTDs research in recent decades.

The complexity of symptoms and fungi involved in these diseases is great, and this is particularly true for “Esca disease” (in this paper, when the literature data refer to this generic term – as well as when we will arbitrarily refer to this generic term to avoid nomenclature confusion when critically discussing the literature – we will place quotation marks around the term “Esca disease”). Historically, Esca, a word of indo-european origin meaning “food”, tinder for fire, used to indicate “amadou” i.e. white rot (Viala, 1922, on the chapter written by Gard in “Bulletin de la Société de Pathologie Végétale”, 1922; Montanari, 2010), had been used for a grapevine wood rot disease. Later, the term was associated with foliar symptoms, described as chronic or acute forms (Viala, 1926; Larignon and Dubos, 1997; Letousey *et al.*, 2010; Lecomte *et al.*, 2012), and was shown to involve several different symptoms associated with different pathogens. It was then proposed as a disease complex involving multiple pathogens including basidiomycetes and/or ascomycetes (Mugnai *et al.*, 1999; Surico, 2009; Bertsch *et al.*, 2013). These caused separate diseases including: *i*) white rot (Esca) that develops mostly in old vines; *ii*) vascular diseases, widely present in propagation material and young vines (brown wood streaking of grape cuttings and Petri disease); and *iii*) Grapevine Leaf Stripe Disease (GLSD), which has an unusual epidemiology and symptomatology that can be associated with some or all of the wood pathogens, i.e. only vascular and canker agents, or, very often, also wood decay in all possible combinations. The condition where white rot (Esca) and GLSD occur together can be indicated as “Esca proper”, in recognition of the original disease description.

The frequency of GLSD foliar symptoms has increased considerably over the last two decades. A preliminary study (Fussler *et al.*, 2008) indicated mean incidence increase of 3.25% for “Esca disease” (leaf stripe and apoplexy symptoms) in France between 2003 and 2005. “Esca disease” and *Eutypiosis* were responsible together for 10% of vine replacements in Alsace (Kuntzmann *et al.*, 2010). Also in France, Bruez *et al.* (2013) showed that incidence increase varied according to region. In Austria, Reizenzein *et al.* (2000) estimated a 2.7% annual increase of plants showing “Esca disease” foliar symptoms. In Italy, Surico *et al.* (2006) indicated an increase from 30 to 51% between 2000 and 2006, and Romanazzi *et al.* (2009) showed how disease incidences reached 60 to 80% in many old vineyards of south-

ern Italy. A comprehensive survey for 22 European and Mediterranean vine-growing countries (COST Action; Guérin-Dubrana *et al.*, 2019) described GLSD trends in most surveyed countries as “increasing” and/or “worrying”, particularly in France, Italy, Spain and Turkey. In Germany, in 12 intensively pruned vineyards of red and white grape varieties and resistant and traditional cultivars, incidence of GLSD increased from 1.9% in 2015 to 3.6% in 2018, and was greatest in 2017 at 4.5% of vines affected (Kraus *et al.*, 2019).

Some observations on Esca complex of diseases are now well accepted, despite the complexity, terminology evolution, and difficulties in understanding the interactions of variables that affect symptom expression. These include:

i) The interactions with environmental, pedo-climatic and agronomic factors/practices that can affect symptom expression and disease severity (Marchi *et al.*, 2006; Calzarano *et al.*, 2018a; Lecomte *et al.*, 2018; Fischer and Peighami-Ashnaei, 2019; Songy *et al.*, 2019a).

ii) No completely resistant grape cultivar has been reported, but cultivar and clone contributions to symptom expression and severity have been observed and reviewed (Marchi, 2001; Quaglia *et al.*, 2009; Murolo and Romanazzi, 2014; Kraus *et al.*, 2019; Moret *et al.*, 2019; Songy *et al.*, 2019a; Moret *et al.*, 2021).

iii) The nutritional (especially macronutrient) status of vines can affect foliar symptom expression (Calzarano *et al.*, 2009, 2021).

iv) Although the presence of an exceptionally wide mycoflora in Esca- and GLSD-affected vines has been confirmed by meta-barcoding (Del Frari *et al.*, 2019a; Niem *et al.*, 2020), the pathogens most frequently associated with the wood infections are the two Ascomycota *Phaeoconiella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & L. Mugnai) (Crous and Gams, 2000) (*Pch*) and *Phaeoacremonium minimum* (Tul. & C. Tul.) Gramaje, L. Mostert & Crous (Gramaje *et al.*, 2015) (*Pmin*) (syn. *Phaeoacremonium aleophilum*), while the most frequently isolated basidiomycete in Europe has been *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch. (Fischer, 2002) (*Fmed*). The two Ascomycota species have mostly been associated with the “phaeotracheomycotic complex” (brown wood streaking, Petri disease and GLSD; Bertsch *et al.*, 2013), while *Fmed* or the other basidiomycetes causing wood decay (Fischer and González-García, 2015) have only been associated with white rot, Esca and “Esca proper”. Nevertheless, decay elimination (curettage) reduced foliar symptoms, and correlations between white rot extent, elimination and foliar symptom expression have been reported (Maher *et al.*, 2012; Thibault, 2015; Cholet *et al.*, 2019, 2021; Pacetti *et al.*, 2021).

Fomitiporia mediterranea (as *Fomitiporia punctata*) was shown to be a primary pathogen by artificial inoculations, either in vineyards or in greenhouse experiments (Sparapano *et al.*, 2000a; 2001a). The need for specific successions of fungi in wood colonization to detoxify wood cellular microenvironments from excesses of polyphenols produced by plant reactions has been suggested but was never fully proved (Larignon and Dubos, 1997; Mugnai *et al.*, 1997; Amalfitano *et al.*, 2000). Microbial combinations between *Fmed*, *Pch* and some bacterial taxa (i.e. *Sphingomonas* spp. and *Mycobacterium* spp.) may have a role in the onset of “Esca disease” in young vines (Bruez *et al.*, 2020). Synergism between *Fmed* and bacteria such as *Paenibacillus* spp. for grapevine wood component degradation has also been confirmed (Haidar *et al.*, 2021).

Despite the year-to-year fluctuations in incidence, foliar symptom surveys represent simple and non-invasive ways to indirectly assess grapevine wood infection by Esca complex pathogens, and for determining epidemiology, crop losses and health status of vineyards (Guérin-Dubrana *et al.*, 2013). Claverie *et al.* (2020) summarised knowledge on foliar symptom outbreak in the “toxins hypothesis” and “hydraulic dysfunction hypothesis”. The first describes how phytotoxic compounds produced by “Esca disease”-associated fungi could diffuse through host transpiration stream sap flow to leaves, inducing the typical tiger-striped leaf patterns (Abou-Mansour *et al.*, 2004; Bruno and Sparapano, 2006b; Andolfi *et al.*, 2011). The second hypothesis explains how impairment of sap flow to leaves, mainly caused by vessel occlusions/pathogen compartmentalization, could lead to cavitation contributing to foliar symptom expression (Pouzoulet *et al.*, 2014, 2017, 2019). Recent findings, however, suggest how these two hypotheses can be complementary and not exclusive, due to observed association between foliar symptoms, disruption of vessel integrity and presence of some “Esca disease”-associated pathogens presence in host trunks, which could elicit a distance-response (Bortolami *et al.*, 2019). Stem vessel occlusion has been related to exacerbation of foliar symptom expression in the following growth season (Bortolami *et al.*, 2021).

Because the two Ascomycota *Pch* and *Pmin* have frequently been associated with foliar symptoms of “Esca disease”-symptomatic plants, considerable research has been carried out on *Pch* and *Pmin* biology and pathogenicity, and a more comprehensive and integrated view on these species was presented by authors such as Valtaud *et al.* (2009), Mostert *et al.* (2006) and Gramaje *et al.* (2015). The same cannot be affirmed for *Fmed*. Despite progress made since taxonomic description of this fungus (Fischer, 2002), knowledge on the pathogen, its wood

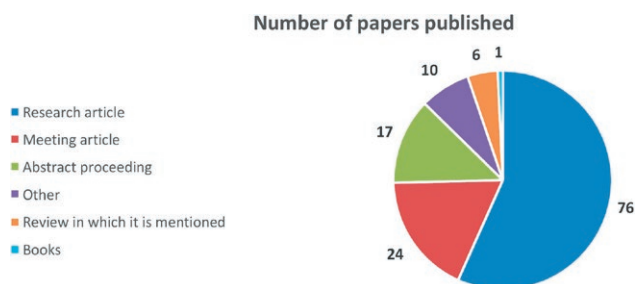


Figure 1. Number of published papers dealing with *Fomitiporia mediterranea* from 2002 (*Fmed* identification date) to 2021, as indexed in the Web of Science™ database (Thomson Reuters).

degradation process and relationship with the other Esca complex diseases, is fragmented. There are few reviews which consider *Fmed* as part of “Esca disease” or GTDs in general, and to our knowledge no comprehensive review on *Fmed* alone has been undertaken (Figure 1).

For this reason, along with contrasting reports of correlations between amounts of white rot necrotic tissues (thus *Fmed* presence) and the leaf stripe symptoms (Maher *et al.*, 2012; Bruez *et al.*, 2014; Bruez *et al.*, 2020; Cholet *et al.*, 2021; Pacetti *et al.*, 2021), and reports of little or no correlation between these factors (Edwards *et al.*, 2001; Calzarano and Di Marco 2007; Romanazzi *et al.*, 2009; Mugnai *et al.*, 2010), a review of *Fmed* is necessary, in order to collect knowledge of the fungus itself, and to stimulate scientific debate and novel ideas in the context of GTDs.

BASIDIOMYCETES ASSOCIATED WITH ESCA

Knowledge on basidiomycetes associated with “Esca disease” has increased, and Fischer (2006), Fischer and González-García (2015), and Cloete *et al.* (2015a, 2016) provided a comprehensive compendium on the topic. Ravaz (1909) was a pioneer in grapevine basidiomycete identification, with the putative identification of *Phellinus igniarius* (L.) Quél. (at the time *Fomes igniarius* (L.) Fr. and formerly *Polyporus igniarius* (L.) Fr. based on fruit bodies found on diseased grapevines in southern France). Vinet (1909) and Viala (1926) also reported the presence of *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. in French vineyards. These two basidiomycetes were long considered as causal agents of Esca wood decay but pathogenicity was only proven for *P. igniarius* (most likely a *Fomitiporia* sp.) by Chiarappa (1997).

Studies on “Esca disease” and its etiology multiplied in the late 1990s, especially when Larignon and Dubos (1997) isolated *Phellinus punctatus* (P. Karst.) Pilát from Esca wood decay in French vineyards. After studies of

the infrageneric structure of *Phellinus* s.l. by Fiasson and Niemelä (1984), Fischer (1996) and Wagner and Fischer (2001, 2002), *P. punctatus* was grouped within *Fomitiporia*, as *F. punctata* (P. Karst) Murrill (= *P. punctatus*). Multiple surveys of Italian vineyards by Cortesi *et al.* (2000) concluded that the main cause of decay in Esca-affected vines was *F. punctata*, later recognized as the new species *F. mediterranea* (Fischer 2002), which is now considered the main white rot agent in “Esca disease” in Europe and Mediterranean regions.

Stereum hirsutum was isolated by Larignon and Dubos (1997) from central decayed grapevine wood inhabited by putative *P. igniarius*, but its role in GLSD is still debated, although it is clearly a white rot basidiomycete agent. Some authors have suggested that this fungus has little or no role in the Esca complex of disease because it is found only rarely in vineyards (Mugnai *et al.*, 1999; Cortesi *et al.*, 2000; Reizenzein *et al.*, 2000; Vicent *et al.*, 2001). In any case, *S. hirsutum* may act as a weak facultative parasite, occasionally penetrating the heartwood of host plants and producing very limited infections and decay of the inner host tissues (Fischer and González-García, 2015).

Many other basidiomycetes have been isolated from decaying grapevine wood. White *et al.* (2011) characterised ten possibly novel taxa belonging to *Hymenochaetales* associated with “Esca disease”, *i.e.* white rot on GLSD symptomatic vines. For Europe, an annotated checklist of GTD-related basidiomycete taxa has been published (Fischer and González-García, 2015). With the advent of metagenomic approaches, reports of basidiomycetes are increasing (Del Frari *et al.*, 2019a; Bruez *et al.*, 2020). A recent study by Brown *et al.* (2020) aimed to clarify the relevance of basidiomycete colonisation within the Esca complex of diseases. They isolated many taxa (including new species, such as *Inonotus vitis* A.A. Brown, D.P. Lawr. & K. Baumgartner, *Tropicoporus texanus* A.A. Brown, D.P. Lawr. & K. Baumgartner, and *Fomitiporia ignea* A.A. Brown, D.P. Lawr. & K. Baumgartner) from white rot and black/brown discoloured wood collected from grapevine plants expressing GLSD foliar or shoot symptoms in Californian and Texan vineyards.

More *Fomitiporia* spp. have been associated with “Esca-diseased” grapevines in other regions, including *Fomitiporia australiensis* M. Fisch., Jacq. Edwards, Cunningt. and Pascoe in Australia (Fischer *et al.*, 2005), *Fomitiporia polymorpha* M. Fisch. in California (Fischer and Binder, 2004), *Fomitiporia capensis* M. Fisch., M. Cloete, L. Mostert, F. Halleen in South Africa (Cloete *et al.*, 2014), *F. ignea* (Brown *et al.*, 2020) in Texas, and, more recently, *Fomitiporia punicata* Y.C. Dai, B.K. Cui & Decock in China (Ye *et al.*, 2021), originally described

on *Punica granatum* (Dai *et al.*, 2008). As well, *Fomitiporia erecta* A. David, Dequatre & Fiasson, and *F. punctata* were mentioned as occurring on grapevine in Spain (Fischer and González-García, 2015). Of these species, *F. australiensis*, *F. capensis* and *F. ignea* were exclusively documented from grapevine.

Geographic distribution and host range of *Fmed* have probably expanded in recent decades. This is supported by the number of host plants in the different regions. In Central Europe the host range is largely limited to *Vitis vinifera*, given the scarcity of reports of the fungus on other hosts: i.e. on *Laurus nobilis* (Fischer, 2006) and on *Robinia pseudoacacia* (Schmidt *et al.*, 2012). However, *Fmed* occurs on several other hosts in the Mediterranean area (see below). This discrepancy in the reported host range indicates a recent invasion of the fungus into the viticultural regions of Central Europe, possibly associated with climatic changes leading to increased temperatures in this region.

These observations indicate that intrinsic geographic and climate conditions play roles in diffusion of Basidiomycota pathogens and influence spread of *Fomitiporia* spp. in vineyards (Fischer *et al.*, 2005; Fischer, 2006; Cloete *et al.*, 2014). Geographical variations influence distribution of fungi among different locations (Hofman and Arnold, 2008; Dietzel *et al.*, 2019), and climate is a major abiotic factor shaping fungal biogeography (Castillo and Plata, 2016; Větrovský *et al.*, 2019). Spatial analyses of “Esca-disease”-related basidiomycete taxa, and comprehensive screening of possible non-*Vitis* host plants, preferably from proximity of vineyards, could help to identify key pedo-agroclimatic factors affecting their diffusion, and could indicate why some *Fomitiporia* spp. are retrieved from some areas but not others.

In Europe information on grapevine white rot agents began to be revised in 2002: Fischer found that strains formerly acknowledged as *F. punctata* collected from grapevines in Italy and Germany differed from strains from other hosts and other geographic areas (Central Europe). Molecular diagnoses (ITS data), pairing tests of single spore isolates, compared with temperature preferences of cultured mycelia allowed description of the new species *Fomitiporia mediterranea* M. Fischer (Fischer, 2002). This is currently considered the main causal agent of white rot in “Esca diseased” grapevines in Europe and in Mediterranean climate areas, while *F. punctata* is more ubiquitous, although a European centred distribution has been suggested by Decock *et al.* (2007).

Due to indistinguishable morphology between *Fmed* and *F. punctata*, but the highlighted phylogenetic differences, previous isolates and findings attributed to *F. punctata* should be reconsidered as possibly assignable to

Fmed (Fischer, 2002; Ciccarone *et al.*, 2004; Fischer, 2006). Recent findings on *P. punctatus* and *P. pseudopunctatus* A. David Dequatre and Fiasson by Polemis *et al.* (2019) and Markakis *et al.* (2019) have reinforced that possible misidentification led to the underestimation of *F. mediterranea* incidence in the Mediterranean region.

This review focuses only on *Fmed* and its role in Esca-related wood degradation, with careful reconsideration of previous reports where the pathogen may have been incorrectly identified.

IDENTIFICATION, TAXONOMY, HOST RANGE, AND SYMPTOMS INDUCED IN GRAPEVINES

Description of fruit bodies and mycelia

Morphology and anatomy of *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetaceae, Hymenochaetales, Agaricomycetes, Basidiomycota) were described by Fischer (2002).

Fomitiporia mediterranea fruiting bodies (Figure 2) are resupinate, inseparable, and hard woody, up to 15 mm thick with yellowish-brown narrow margins, containing subglobose to oval basidiospores. The hyphal system is dimitic, with generative and skeletal hyphae. Detailed descriptions of the hyphal system, fruiting bodies and basidiospores of this fungus were provided by Fischer (2002, 2009) and Fischer and González-García (2015).

Figure 3, A, B and C show, respectively, a tube mouth with outgrowth of vegetative hyphae, outgrowing hyphae from naturally infected grapevine wood and the pore surface of a fruiting body of *F. mediterranea*.

After isolation from infected wood and/or fruit bodies, mycelial isolates may develop into a so-called “bleaching type” (Type B: Fischer, 1987) or a “staining type” (Type S: Fischer, 1987) (Figure 4).

Type B mycelium has a cottony to woolly appearance, and aerial hyphae are yellowish to brown. Medium pigmentation is sparse or absent. Type S-mycelium has sparse aerial hyphae, and medium pigmentation is strong. Colony growth after 14 days at 21°C on Malt Extract (ME) agar in complete darkness was more rapid in bleaching-type isolates (colony diameter = 3.0 to 4.5 cm) than staining-type isolates (1.5 to 2.5 cm). The two mycelium types may alternate over ensuing inoculations. Growth was confirmed between 15 and 35°C, with optimum growth at 30°C (Fischer, 2002, 2006; Fischer and Kassemeyer, 2003). Under laboratory conditions, sporulation is absent in *Fmed*. Spore germination tests with spores from actively sporulating fruit bodies were performed for some *Fmed* strains, indicating very low germination rates (less than 1%) with a high variation in germination times (Fischer, 2002).



Figure 2. Fruiting bodies of *Fomitiporia mediterranea* on a grapevine trunk. Photograph taken in July 2018, from 'Sauvignon Blanc', in a vineyard in Ehrenkirchen, Germany.

Spread by basidiospores is considered the main dispersal form for *Fmed* and this has been described to be mainly via rain and wind (Cortesi *et al.*, 2000). In Central European vineyards, fruiting body sporulation is increased after rainy periods and is related to daily temperatures greater than 10°C and relative humidity greater than 80% (Fischer, 2009).

Mating system

Studies of the *Fmed* mating system were also affected by misidentification of the pathogen. Fischer

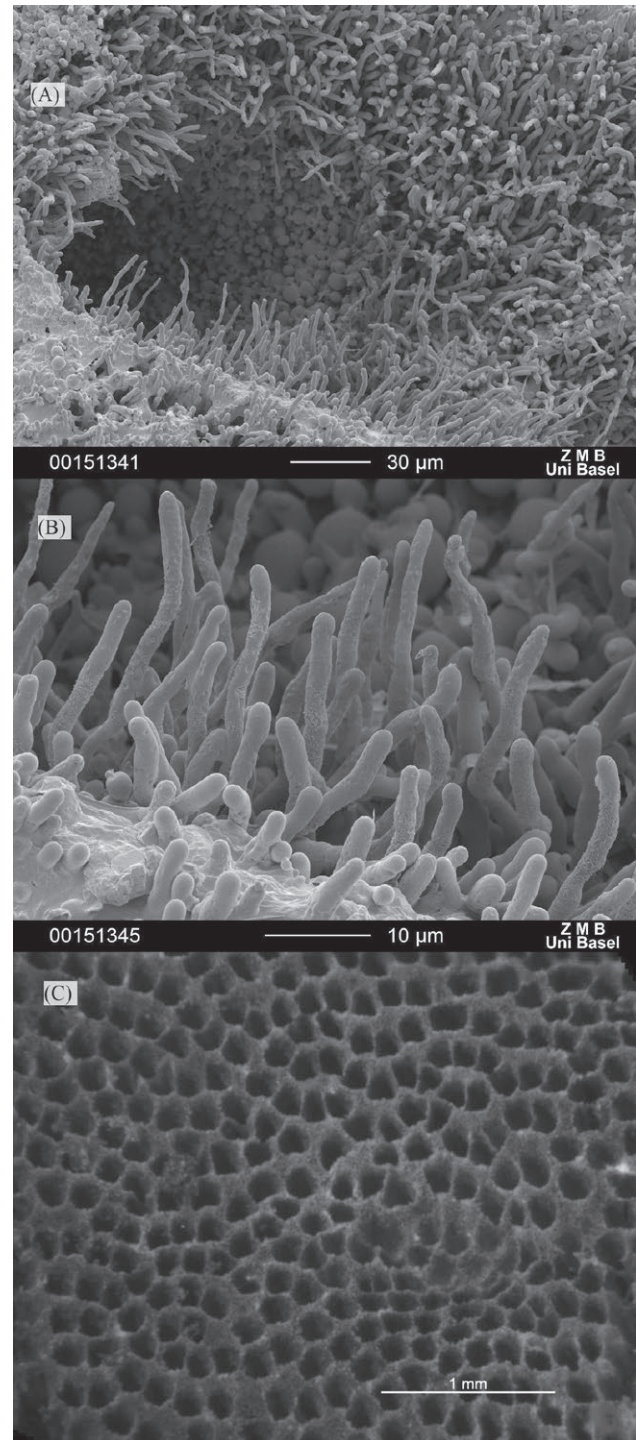


Figure 3. (A), Cryo-Scanning-Electron-Microscopy (Cryo-SEM) micrograph ($\times 500$ magnification) of an *Fmed* tube mouth showing outgrowth of vegetative hyphae. (B), Cryo-SEM micrograph ($\times 2,000$) of hyphae in a cross section of a grapevine trunk naturally affected by white rot. (C), Stereo micrograph of the surface of an *Fmed* fruiting body ($\times 50$). The pores are 5-8/mm. The diseased grapevine specimen was collected in a vineyard in Pfaffenweiler, south-west Germany.

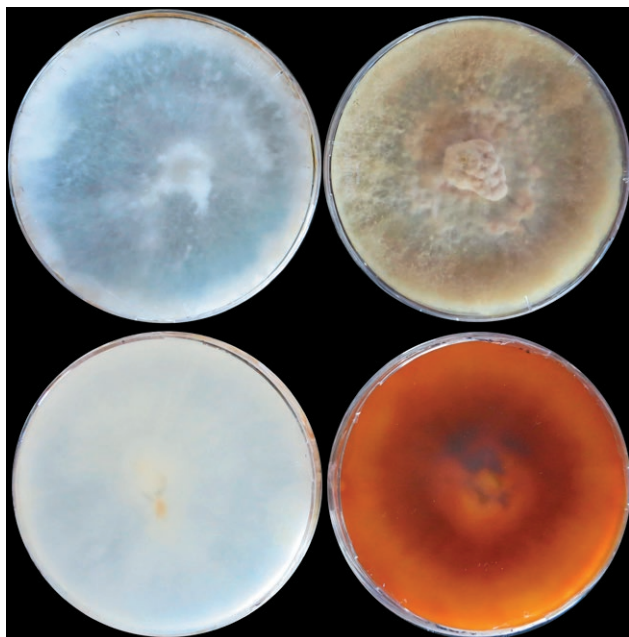


Figure 4. Mycelium cultures of *Fomitiporia mediterranea* on malt extract agar (ME) after 28 days of incubation. “Type B” (left, surface and reverse side) and “Type S” (right, surface and reverse side).

(1996) described *F. punctata* strains (later distinguished from *Fmed*) as homothallic, with no mating types evident in pairings of spores originating from one fruiting body. The time lag between separation of *Fmed* from *F. punctata* by Fischer (2002) and the research of Jamaux-Despreaux and Péros (2003) initially provided conflicting reports of the homothallic mating system described for the fungus. Jamaux-Despreaux and Péros (2003) observed outcrossing populations in France and Italy. This was indicated by high genetic variation within and between vineyards, and random assortment of genetic markers. They therefore suggested possible existence of non-outcrossing populations in other areas. Following correct assignment of species, it was shown that *Fmed* was a heterothallic bipolar species (Fischer, 2002), while *F. punctata* was confirmed as homothallic.

A variety of pairing tests were conducted by Fischer (2002), who demonstrated a range of compatible and incompatible reactions (see Fischer, 2002 for details). Growth of secondary mycelia was stronger in compatible inter-strain than in intra-strain pairings. Mycelia formed from inter-strain pairings could prevail under natural conditions, resulting in high outcrossing rates.

It is now accepted that basidiomycete mating is regulated by different genes, grouped in two types of homeodomain transcription factors (*HD genes*), in pheromone genes and their related receptors and response genes (*PR genes*). These genes can reside in linked or un-linked

chromosome loci (James *et al.*, 2006; Kües *et al.*, 2013, 2015). James *et al.* (2013) highlighted at least four *HD* (two pairs of *HD1* and two pairs of *HD2*), and several apparently functional *PR genes* in the *Fmed* genome, such as 2 *STE3*, several *MAP* kinases and 3 *Prf1*. These authors also suggested that the genes were not linked in a unique mating locus (James *et al.*, 2013; Kües *et al.*, 2015).

Further pairing tests, perhaps with other strains, could better clarify the dispersal system of the fungus, and identify other possible intersterility groups. This would be further clarified if genetic variability data retrieved from German vineyards were considered. Fischer (2012) found 14 different *Fmed* genotypes out of 15 fruit bodies, all derived from one vineyard. Lentès and Fischer (personal communication) identified 56 genotypes out of 64 isolated mycelia, derived from different vines in two vineyards in the Moselle region of Germany.

Available *Fmed* genome could provide new information for expression analysis of mating-associated genes, especially in response to changing environmental conditions which are increasingly affecting European vineyards. Increasing this knowledge could provide a better understanding on pathogen spread and genetic recombination, since *Fomitiporia* spp. are well adapted to different conditions and climates, as reflected by their biogeographical variability.

Field identification

Compared to white rot presence, fruiting bodies of *Fmed* are very rarely found in vineyards, mostly on the uppermost parts of trunks, near pruning wounds, which are the main sites of infection (Cortesi *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2005; Fischer, 2006; Fischer and González-García, 2015). In vineyards in Central Europe, *Fmed* fruiting bodies were only present on 1 to 3% of “Escadiseased” grapevines that were older than 15 years (Fischer, 2009), and the pathogen was detected as vegetative mycelium in infected hosts. In Germany, a 100:1 ratio is mentioned by Fischer (2006) indicating a low co-occurrence of vegetative mycelium with white rot and fruiting bodies. This was also reported in Tuscan vineyards by Cortesi *et al.* (2000). Because compatibility groups were identified (Fischer, 2002), the occasional occurrence of fruiting bodies in vineyards may be partly explained by the possibly rare contact between sexually compatible basidiospores (Jamaux-Despreaux and Péros, 2003). Dead grapevine trunks are the most favourable substrates for development of fruiting bodies, and the dead trunks are usually removed from vineyards. Another hypothesis to explain the low ratio between white rot and fruiting bodies in non-Central European countries is that the disease

Table 1. Host range and geographic distribution of *Fomitiporia mediterranea* M. Fischer 2002. For each host (and each country), the table includes first reports which used classical isolations, and some of the significant subsequent reports/studies which used molecular classification and metagenomic approaches. References accompanied by “†” refer to studies which used former classifications (as *Phellinus punctatus* or *F. punctata*) which should be carefully reconsidered as representing *F. mediterranea*.

Host	Country	References	
<i>Vitis vinifera</i>	Algeria	Berraf and Péros, 2005	
	Austria	Fischer <i>et al.</i> , 2006	
	Czech Republic	Baranek <i>et al.</i> , 2018	
	France	†Larignon and Dubos, 1997; †Jamaux-Despreaux and Péros, 2003; Péros <i>et al.</i> , 2008; Laveau <i>et al.</i> , 2009; Kuntzmann <i>et al.</i> , 2010; Ouadi <i>et al.</i> , 2019; Bruez <i>et al.</i> , 2020	
	Germany	Fischer, 2002; Fischer and Kassemeyer, 2003; Fischer, 2006; Fischer, 2012; Fischer and González-García, 2015; Fischer, 2019	
	Greece	†Rumbos and Rumbou, 2001	
	Hungary	Rábai <i>et al.</i> , 2008	
	Iran	†Karimi <i>et al.</i> , 2001; Farashiyani <i>et al.</i> , 2012; Mohammadi <i>et al.</i> , 2013; Rajaiyan <i>et al.</i> 2013; Amarloo <i>et al.</i> , 2020; Mirabolfathy <i>et al.</i> , 2021	
	Italy	†Mugnai <i>et al.</i> , 1999; †Cortesi <i>et al.</i> , 2000; Ciccarone <i>et al.</i> , 2004; Romanazzi <i>et al.</i> , 2009; Quaglia <i>et al.</i> , 2009; Del Frari <i>et al.</i> , 2019a; Girometta <i>et al.</i> , 2020; Pacetti <i>et al.</i> , 2021	
	Lebanon	Choueiri <i>et al.</i> , 2014	
	Portugal	Sofia <i>et al.</i> , 2006	
	Slovenia	Rusjan <i>et al.</i> , 2017	
	Spain	†Armengol <i>et al.</i> , 2001; Martin and Cobos, 2007; Sánchez-Torres <i>et al.</i> , 2008; Luque <i>et al.</i> , 2009; Garcia Benavides <i>et al.</i> , 2013; Elena <i>et al.</i> , 2018	
	Switzerland	Fischer, 2006	
	Turkey	Akgül <i>et al.</i> , 2015	
	<i>Acer negundo</i>	Italy	Fischer, 2002
	<i>Actinidia</i> spp.	Greece	†Elena and Paplomatas, 2002
Italy		Fischer, 2002; Di Marco <i>et al.</i> , 2004a; Di Marco and Osti, 2008; Girometta <i>et al.</i> , 2020	
<i>Albizia julibrissin</i>	Greece	Markakis <i>et al.</i> , 2017	
<i>Cistus</i> sp.	Italy	Girometta <i>et al.</i> , 2020	
<i>Citrus</i> spp.	Greece	Elena <i>et al.</i> , 2006	
	Italy	Rocchetti <i>et al.</i> , 2014	
<i>Corylus avellana</i>	Italy	Pilotti <i>et al.</i> , 2010; Girometta <i>et al.</i> , 2020	
<i>Elaeagnus angustifolia</i>	Iran	Ahmadyusefi and Mohammadi, 2019	
<i>Fagus sylvatica</i>	Italy	Girometta <i>et al.</i> , 2020	
<i>Fortunella japonica</i>	Greece	Markakis <i>et al.</i> , 2017	
<i>Hedera helix</i>	Italy	Girometta <i>et al.</i> , 2020	
<i>Lagerstroemia indica</i>	Italy	Fischer, 2002	
<i>Laurus nobilis</i>	Slovenia	Fischer, 2006	
<i>Ligustrum vulgare</i>	Italy	Fischer, 2006	
<i>Olea europaea</i>	Greece	†Paplomatas <i>et al.</i> , 2006; Markakis <i>et al.</i> , 2017; Markakis <i>et al.</i> , 2019	
	Italy	Fischer, 2002 ; Carlucci <i>et al.</i> , 2013	
<i>Platanus x acerifolia</i>	Italy	Pilotti <i>et al.</i> , 2005	
<i>Prunus dulcis</i>	Spain	Olmo <i>et al.</i> , 2017	
<i>Punica granatum</i>	Greece	Markakis <i>et al.</i> , 2017	
<i>Pyrus communis</i>	Greece	Markakis <i>et al.</i> , 2017	
<i>Quercus ilex</i>	Italy	Fischer, 2006	
<i>Quercus robur</i>	Italy	Girometta <i>et al.</i> , 2020	
<i>Quercus rubra</i>	Italy	Girometta <i>et al.</i> , 2020	
<i>Robinia pseudoacacia</i>	Italy	Fischer, 2006; Girometta <i>et al.</i> , 2020	
	Germany	Schmidt <i>et al.</i> , 2012	
<i>Salix alba</i>	Italy	Girometta <i>et al.</i> , 2020	
<i>Ulmus</i> spp.	Iran	Mirsoleymani and Mostowfizadeh Ghalamfarsa, 2019	

and fungus structures could occur in several alternative hosts within or near vineyards (see Table 1). These sources of inoculum could be important. The discrepancies between occurrence of vegetative mycelia and fruit bodies are often large in lignicolous fungi. While the existence of *F. mediterranea* fruiting bodies may be underestimated (Fischer 2006), precise evaluation of exogenous inoculum sources remains a challenging issue.

Field identification of *Fomitiporia* spp. on grapevines is often complex. Because fruiting bodies are very rare and have very similar morphologies, molecular diagnoses after isolations from infected wood tissues or fruiting bodies are likely to be the most reliable tools for identification of mycelia not clearly assignable to particular species (Ciccarone *et al.*, 2004).

Overview of molecular diagnosis, taxonomy and phylogeny

Amplifications and sequencing of ITS regions with or without Large Sub-Unit (LSU) translation elongation factor subunit 1- α (*tef1*) and the second largest subunit of RNA polymerase II (*RPB2*) sequence analysis, have permitted new advances in classification of grapevine basidiomycetes using specific primers. Reports are increasing, differentiating new *Fomitiporia* species (Cloete *et al.*, 2016; Chen and Cui, 2017; Brown *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2021; Ye *et al.*, 2021).

Fischer (2002) reported a specific method for identification, based on the nuclear encoded ribosomal DNA region ITS1-5.8S-ITS2 using the primer pair prITS5 and prITS4 (White *et al.*, 1990). Compared to other *Fomitiporia* spp., *Fmed* strains showed unique small insertions in both ITS regions: between nucleotides 201 and 206 (AATAAT) in ITS1 and between nucleotides 748 and 745 (CCTTTGA) in ITS2 (Fischer, 2002; 2006; Fischer and Binder, 2004). Since 2006, specific primers based on these insertions have been available for differentiation of *Fmed* from other species such as *F. punctata* and *F. australiensis* (Fischer, 2006). The primer sequences and characteristics are as follows: pr*Fmed1*, 5' GCA GTA GTA ATA ATA ACA ATC 3' (GC = 28.6%, TM = 50.1°C); and pr*Fmed2*, 5' GGT CAA AGG AGT CAA ATG GT 3' (GC = 45%, TM = 55.3°C). A 550 bp product is only obtained for *Fmed*. Parameters for successful amplification were described by Fischer (2006).

With basidiospores being the main dissemination agent of *Fmed*, considerable genetic variation in *F. punctata* (probably *Fmed*) has been described by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. This variation has been shown among isolates derived from individual vineyards (Pollastro *et al.*, 2000; Jamaux-Despreaux and Péros, 2003). Pollastro *et al.* (2001) successfully developed

sequence-characterised amplified region (SCAR) primers suitable as a molecular diagnostic tool for *Fmed*.

The primer pair ITS1 and ITS4 (White *et al.*, 1990) have also been successfully used for identification of *Fmed* isolates within an Italian mycological collection based on fresh mycelial isolates (Girometta *et al.*, 2020).

Other *Fomitiporia* species recorded from grapevine include: *F. polymorpha*, *F. capensis*, *F. australiensis*, *F. ignea*, *F. erecta*, *F. punctata*, and *F. punicata*. For *F. polymorpha*, *F. australiensis*, *F. erecta* and *F. punctata*, characterization of the ITS1-5.8S-ITS2 region was sufficient either to describe them as separate species, or to establish phylogenetic relationships with other *Fomitiporia* spp. (Fischer and Binder, 2004; Fischer *et al.*, 2005; Fischer and González-García, 2015). Implication of other conserved genetic regions has distinguished these other species above mentioned, using the LSU unit ribosomal RNA-encoding regions *tef1* and *RPB2* together with ITS data to describe them (Cloete *et al.*, 2014; Brown *et al.*, 2020; Ye *et al.*, 2021). Nevertheless, species-specific primers are available only for *Fmed* (Fischer, 2006), although unique forward primers paired with ITS4 primers have been designed to successfully detect *F. capensis* (Bester *et al.*, 2015).

Host range and geographical distribution

Fomitiporia mediterranea is considered to be a highly adaptable species, based on the diversity of host plants, and occurrence in different regions and climates.

Isolates from grapevine were retrieved from a range of climate conditions, according to the most updated version of the original Köppen-Geiger climate classification map (Geiger, 1961; Beck *et al.*, 2018): from “Mediterranean and temperate humid-subtropical climates” (for most of non-Central European isolates of the pathogen), to “arid and semi-arid climate” (for Algerian, Iranian and some of the non-Central European isolates), to “cool temperate climate” (for most of the Central-European isolates)” (see Figure 5 for the detailed geographical distribution of *Fmed*). Throughout its geographical range, *Fmed* shows close affinity with *V. vinifera*. However, this may be due to the economic significance of grapevine in these regions, resulting in detailed field observations for vineyards compared with other woody hosts. The fungus is also found on other host plants outside non-Central European countries, potentially resulting in increased infection pressure on grapevines (see Table 1 for a detailed list of hosts in different countries). Fischer (2002, 2006) postulated that, at least for non-Central European countries, alternative hosts could be foci for development of *Fmed* fruiting bodies, reinforcing the observed high adaptability of the pathogen to mul-

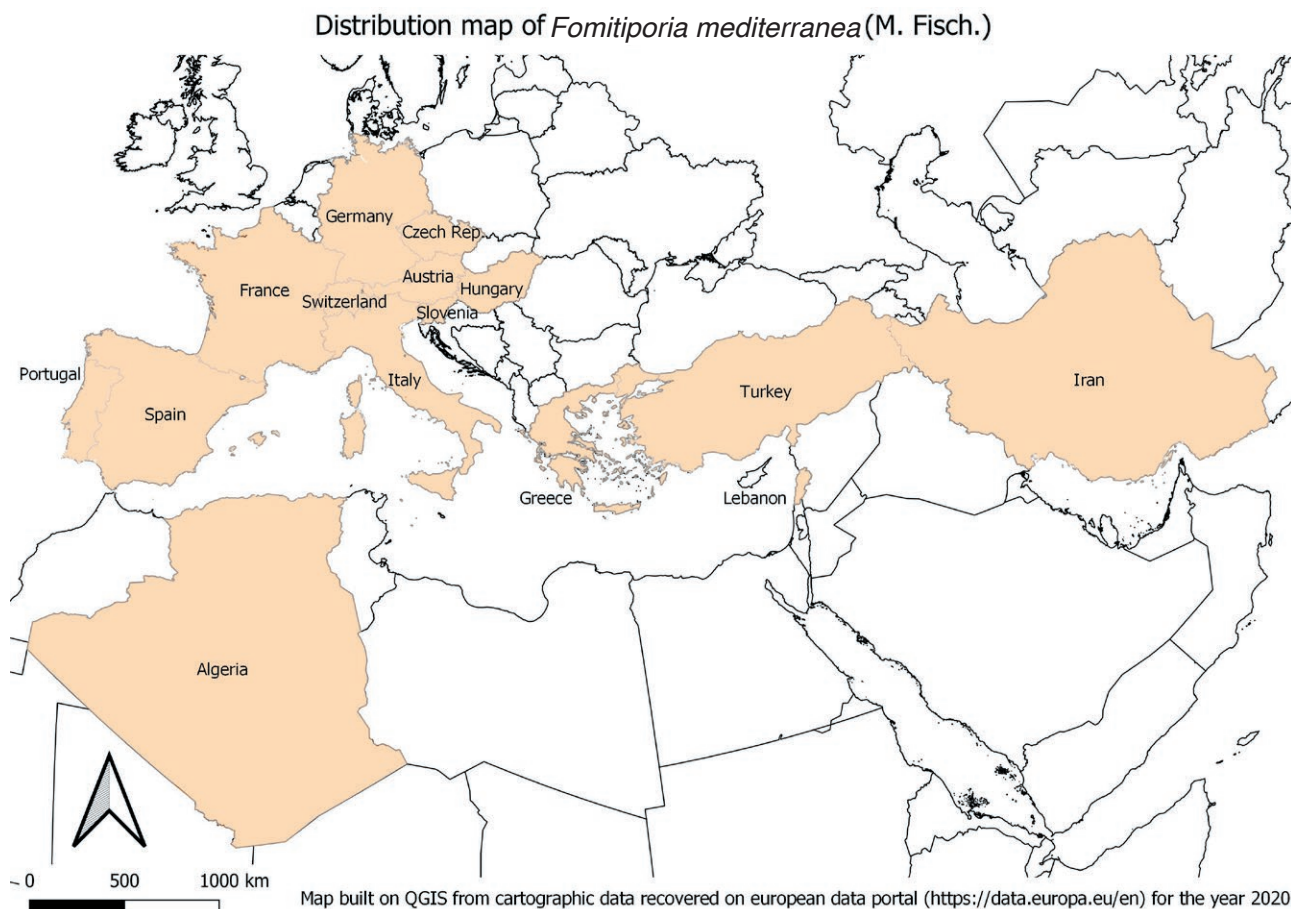


Figure 5. Distribution of *Fomitiporia mediterranea*, based on published reports of isolation of the fungus from grapevine, *Vitis vinifera*. The map was constructed using QGIS software (version 3.10.9-A Coruña).

multiple host species. Although current data show only very few isolations of *Fmed* from Central-European non-*Vitis* hosts, i.e. *Robinia pseudoacacia* in Germany (Schmidt *et al.*, 2012) and *Laurus nobilis* in Slovenia (Fischer, 2006), the potential for the fungus to colonize other hosts is demonstrated. Future studies could focus on: *i*) surveys of fruiting body incidence on alternative hosts in the proximity of vineyards (to better assess inoculum sources); *ii*) performing comparative secretome and metabolome assessment of wood from different hosts to increase knowledge on *Fmed* colonization and growth and fruiting body development; and *iii*) determine pathogenicity to grapevine of isolates from different host plants.

Spread in grapevines and vineyards, wood symptoms and their relationships with foliar symptoms

Fomitiporia mediterranea is mainly retrieved from grapevine white rot necrotic tissue, although its presence

in necrosis borders between white rot and non-necrotic tissues, and adjacent non-necrotic but recently colonised wood has been demonstrated (Fischer, 2002; Péros *et al.*, 2008; Surico, 2009; Bruez *et al.*, 2017; Elena *et al.*, 2018; Bruez *et al.*, 2021; Pacetti *et al.*, 2021). The pathogen needs some time to colonise and decay woody tissues, explaining why it is predominantly found in trunks greater than 10 years old, and only to a lesser extent in young trunks (Sánchez-Torres *et al.*, 2008; Fischer, 2009). White rot has also been mostly reported in old vineyards although it can be sometimes found in young vines and very occasionally in young GLSD symptomatic vines (Edwards *et al.*, 2001; Mugnai *et al.*, 2010).

In the Esca complex of diseases, several diseases have been recognised and have been related to infections by different fungi, and symptom expression can be influenced by many agronomic and environmental factors (cultural practices, host plant age, soil type, weather conditions) (Calzarano *et al.*, 2018a; Gramaje *et*

al., 2018; Lecomte *et al.*, 2018). Distribution of symptomatic vines within a vineyard poorly indicates the dissemination mode of related fungi, including *Fmed*, but diseased vines can be found grouped along vineyard rows. This supports the hypothesis that human-mediated practices are involved in pathogen spread (Mugnai *et al.*, 1999; Guérin-Dubrana *et al.*, 2019). Research on *F. punctata* (likely *Fmed*) isolates obtained from different vines showed they belonged to different somatic incompatibility types (Cortesi *et al.*, 2000), indicating that each vine was colonised by genetically distinct individuals. Similarly, results for *F. punctata* (likely *Fmed*) (Jamaux-Despreaux and Péros, 2003) on the genotypic differences at vineyard level strongly indicated outcrossing reproduction via basidiospores. These results are not consistent with the hypothesis that *Fmed* is spread through wounds by pruning tools. In addition to this genetic evidence, much epidemiological data has shown that “Esca disease” symptoms were spatially random in vineyards (Cortesi *et al.*, 2000; Surico *et al.*, 2000; Sofia *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2017), which is consistent with the hypothesis that basidiospores are the likely agents of dispersal for *Fmed* (Cortesi *et al.*, 2000; Fischer, 2002). Although sporulation is rare on grapevine trunks, the inoculum could come from the many other hosts of the pathogen.

Typically, *Fmed* induces white rot in innermost grapevine wood (Figure 6). The decay is most often observed in arms, stem heads and trunks, with colonisation starting from pruning wounds and extending along entire trunks, mostly in the central parts but occasionally also at trunk bases, with desuckering wounds as entrance points (Larignon and Dubos 1997; Mugnai *et al.*, 1999, 2010; Sparapano *et al.*, 2000a, 2001a; Fischer, 2002; Fischer and Kassemeyer, 2003).

Rot diameters vary and decrease from infection origin points to boundaries with healthy wood (Mugnai *et al.*, 2010). Rootstocks are rarely affected because vines die before white rot reaches rootstock tissues, although white rot has been reported in rootstock tissues (Maher *et al.*, 2012; Elena *et al.*, 2018). However, *Fmed*-related white rot is common in rootstock mother plants (Fischer, 2019).

The main symptom induced by *Fmed* on grapevines is spongy yellowish or bleached decay in wood tissues, but the relationship between wood and external foliar symptoms of “Esca diseased” grapevines is debated. To the best of our knowledge, Lafon (in 1921) was the first author to make this association. He assumed that *P. ignarius* (most likely a *Fomitiporia* sp.) present in the decay was the main agent responsible for the apoplectic form of “Esca disease” and leaf dessication (due to sap flow impairment). However, information on *Fmed*,

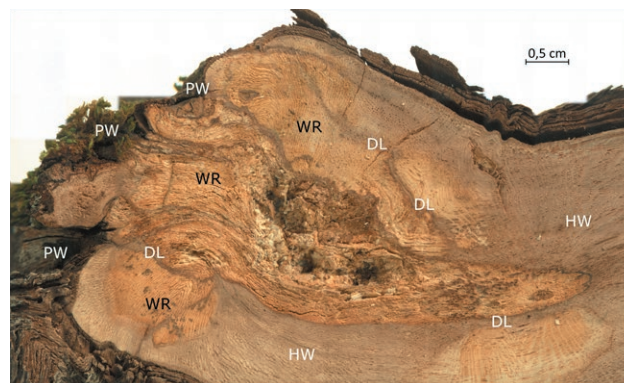


Figure 6. Macroscopic observation by stereo microscopy ($\times 12$ magnification) of a cross section (1 cm thick) of the head of a grapevine stem with a large area of white rot (WR) spreading from pruning wounds (PW) into healthy wood (HW). The necrotic zones are separated from the healthy wood by demarcation lines (DL). Specimen collected in May 2021 from a 28-year-old ‘Sauvignon Blanc’ plant, from a vineyard in Pfaffenweiler, south-west Germany.

grapevine wood symptoms and foliar symptoms needs to be re-examined. Demonstration of *Fmed* to act as a primary grapevine pathogen – after artificial inoculations by mycelial plugs or toothpicks (Sparapano *et al.*, 2000a, 2001a) – confirms the importance of this pathogen within the Esca disease complex. However, research on the actual colonization sequence of “Esca disease”-associated fungi in field-grown grapevines is still required to increase knowledge of relationships between wood decay and foliar symptoms. Under field conditions, basidiospores can be infection agents, and artificial basidiospore inoculations in greenhouses would help to determine the colonization ability of *Fmed* and its role in foliar symptoms. However, basidiospores are difficult to obtain, and rarely germinate under laboratory conditions (Fischer, 2002). Therefore reviewing studies from last two decades will provide insights on the impacts of *Fmed* on “Esca disease” foliar symptoms (GLSD).

Different types of necrosis have been described in “Esca diseased” wood (Larignon and Dubos, 1997). White rot necrosis clearly shows the presence of *Fmed*, which has been the main isolation source of this pathogen in Europe (Larignon and Dubos, 1997; Mugnai *et al.*, 1999; Bruez *et al.*, 2017). Through logistic regression analyses in an old ‘Cabernet Sauvignon’ vineyard, Maher *et al.* (2012) analysed data from presumably 20 to 25 year-old vineyards, and assumed white rot to be the tissue type most strictly associated with the leaf stripe symptoms. A relationship between *Fmed* and “Esca disease” foliar symptoms (GLSD) was shown if white rot presence overcame a 10% necrosis threshold, in vine grafts and/or cordons. Using a similar approach, Calzarano and Di Marco (2007)

showed that, in 32- and 36-year-old vineyards, there was no relationship between severities of wood deterioration and external foliar symptoms. The leaf-symptomatic vines percentage with discoloration (but no white rot) was 46.2% in 32-year-old vineyards and 7.2% in 36-year-old vineyards. Both of these findings have been supported by other authors. Bruez *et al.* (2014) found white rot tissue in cordons from 79% of GLSD-symptomatic 10-year-old vines. Fischer (2012) found 100% of 366 trunks of 28-year-old ‘Traminer’ vines to be affected by white rot, but less than 10% had foliar symptoms. Fischer (2019) also reported a possible correlation between the presence of *Fmed* (but also other GTD related fungi) and leaf symptoms in rootstock mother plants. Ouali *et al.* (2019) observed white rot on 15 to 50% of the total necrotic area of trunks and cordons in 16-year-old ‘Cabernet Sauvignon’ grapevines expressing foliar symptoms. Edwards *et al.* (2010), after fully dissecting trunks of ten GLSD symptomatic vines (aged 4 to 7 years) detected white rot in only one vine. Mugnai *et al.* (2010) dissected nine symptomatic 5- and 6-years-old vines. They found that four of the vines had no white rot and five had traces of decayed wood, mainly following infections from desuckering wounds (Mugnai *et al.*, 2010). These results confirm that white rot, and *Fmed* as the main white rot agent in Europe, becomes increasingly present as vines age, thus becoming increasingly associated with leaf symptoms. The pathogen may play a fundamental role in activating mechanisms leading to the onset of leaf stripe symptoms. However, observations of foliar symptoms not linked to white rot suggest that even if *Fmed* plays a very important role, other factors are also likely to be involved.

In 10-year-old ‘Cabernet Sauvignon’ cordons expressing foliar symptoms, Bruez *et al.* (2020) using meta-barcoding, proposed the link between the onset of GLSD with white rot and a combination of *Fmed*, *Pch* as well as *Sphingomonas* spp. and *Mycobacterium* spp. They suggested that microbiota interactions in white rot necrotic tissues could induce production of phytotoxic secondary metabolites, or increase some shared metabolic pathway, thereby inducing typical GLSD foliar symptoms. *In vitro* production of fungal secondary metabolites by co-culture with bacteria has been documented (Haidar *et al.*, 2016), but occurrence in natural conditions is yet to be assessed.

Cholet *et al.* (2021) and Pacetti *et al.* (2021) have also shown the correlation of white rot with foliar stripe symptoms. Decay elimination (curettage, see below for details) drastically reduced GLSD symptoms during the years following curettage treatment, in 24-year-old ‘Sauvignon Blanc’ and in 14-year-old ‘Cabernet Sauvignon’ plants. Another interesting correlation between white rot

and foliar symptoms came from the curative side: recently, Bruez *et al.* (2021) shown how after sodium arsenite treatment (see below for details), 25-year-old ‘Gewürztraminer’, 27-year-old ‘Chardonnay’ and 40-year-old ‘Merlot’ plants did not shown any foliar symptoms.

In conclusion, the relationship between outbreak of foliar symptoms and white rot in the Esca complex of diseases is widely supported and linked to *Fmed* in Europe, although this is not exclusive as the fungus is absent in young symptomatic vines. Nevertheless, clarifying the mechanisms involved in this relationship will be a big step towards full understanding of the processes leading to the characteristic symptoms and symptom expression timing of GLSD (the symptom fluctuations is not found in other diseases of perennial hosts). Several hypotheses have been proposed for etiology of leaf stripe symptoms, but to understand the role of *Fmed* in development of the disease, an important and essential first step is to detect the signals reaching the leaves and causing the outbreak of these symptoms. In the case of *Fmed* we suggest the following etiology: *i*) joint action of extracellular enzymes and toxins (from *Fmed* or the entire white rot microflora); *ii*) vascular system destruction caused by lignocellulolytic enzymes; *iii*) the formation of low molecular weight diffusible compounds from *Fmed* or from wood degradation-host infection reactions; and *iv*) a combination of these situations and the wood cellular microenvironment.

GENOMIC INFORMATION

Many fungal *Agaricomycetes* genomes have been sequenced by the Joint Genome Institute (JGI) (<http://jgi.doe.gov/fungi>) (Grigoriev IV *et al.*, 2011). According to these data, 93% of the *Agaricomycotina* sequenced genomes are from *Agaricomycetes*. This could be related to the roles of these fungi in trees decay and to their potential applications in biotechnology (Lundel *et al.*, 2014; Hyde *et al.*, 2019). In a comparative genomic study, Floudas *et al.* (2012) sequenced the *Fmed* genome. The final draft assembly was obtained by *in silico* combination of Roche (454), Sanger Fosmids, and Illumina data. Information on genome annotation statistics and composition are available at the MycoCosm portal (<https://mycocosm.jgi.doe.gov>) (Grigoriev IV *et al.*, 2014) and in Floudas *et al.* (2012).

Fmed genome size is approx. 63.35 Mbp which accounts for 11,333 predicted complete gene models with start and stop codons. The genome shows a conspicuous repetitive sequence component, mostly represented by microsatellites and Transposable Elements (TEs). It is

generally accepted that repetitive sequences play roles in *Basidiomycota* genome rearrangements and gene mutations, interrupting genome linearity between strains, and producing strain polymorphisms (Castanera *et al.*, 2017). This could at least partially explain the level of polymorphism detected between strains of *Fmed* (Polastro *et al.*, 2001). Specifically, 4157 microsatellites were detected, most of them (52.27%) being dinucleotides, followed by tri-, mono-, penta-, hexa- and tetra-nucleotide microsatellites. TE analysis revealed a high proportion of TEs coverage (41.42%), representing the greatest for the sequenced genomes in the study. The biggest portion of TEs was LTR-Gypsy elements (21.33%), followed by LTR-Copia, TIR, DNA-transposons and Helitrons. A consistent number of non-classified TEs were reported (Floudas *et al.*, 2012).

Besides constitutive analysis of the genome, Floudas *et al.* (2012) conducted a comparative study with 30 fungal genomes (presenting different ecological strategies), to establish the origin of ligninolytic activity. Through molecular clock analysis of genes encoding Class II Peroxidases (PODs: responsible for lignin degradation), it was possible to date the appearance of ligninolytic activity and the *Agaricomycetes* ancestor (a white rot agent, most likely). The activity probably appeared approx. 290 Ma ago (between the end of Carboniferous and Permian period, Paleozoic era). Subsequently, by Class II PODs-encoding gene expansion through the lineage, five orders of basidiomycetes differentiated, including the *Hymenochaetales* (most likely approx. 237 Ma, during the Triassic period, Mesozoic era). *Fmed* was estimated to have up to 17 Class II PODs-encoding genes in its genome, and these genes can possibly be found clustered with cellobiose dehydrogenase (CDH) encoding genes and other unclassified genes.

Other gene copy numbers expanded in the lineage during *Fmed* genome evolution, such as genes encoding for glycoside hydrolases (GH) families, Fe (III)-reducing glycopeptides (GLP), dye-decolourizing peroxidases (DyP) and laccases (Lac) (Floudas *et al.*, 2012). A detailed report on carbohydrate active enzymes (Cazymes) and class II PODs is presented below.

PATHOGENICITY

In vivo white rot basidiomycete pathogenicity studies on grapevine have been rarely documented (Chiappappa, 1997; Larignon and Dubos, 1997; Sparapano *et al.*, 2000a, 2000b, 2001a; Gatica *et al.*, 2004; Laveau *et al.*, 2009; Luque *et al.*, 2009; Diaz *et al.*, 2013; Akgül *et al.*, 2015; Cloete *et al.*, 2015b; Amarloo *et al.*, 2020; Brown

et al., 2020), but contrasting results to fulfil Koch's postulates were obtained, and the role of basidiomycetes as causes of grapevine foliar symptoms (GLSD) is not clear. Experiments have been conducted either on young or old grapevine plants, but very few of these studies used *Fmed* as inoculum (Larignon and Dubos, 1997; Sparapano *et al.*, 2000a, 2000b, 2001a; Laveau *et al.*, 2009; Luque *et al.*, 2009; Akgül *et al.*, 2015; Amarloo *et al.*, 2020).

The first pathogenicity study on *F. punctatus* (probably *Fmed*) was conducted in France by Larignon and Dubos (1997) to determine the pathogen's role in wood decay. After fungus inoculation of healthy 'Cabernet Sauvignon' wooden blocks or rooted canes, they observed formation of typical white rot only in wooden blocks. As expected the fungus only colonised old wood.

Sparapano *et al.* (2000a), inoculating old vines and assessing wound-induced wood discolouration and white rot symptoms, found that inoculation with *F. punctata* (probably *Fmed*) produced the symptoms with different timing dependant on the cultivar, host plant age and portion inoculated. Specifically white rot formation took: *i*) approx. 6 months after inoculation for symptoms to occur in trunks, branches and spurs of 6-year-old 'Italia', and 9-year-old 'Matilde' plants; *ii*) 2 years after inoculation of 13-year-old 'Sangiovese' vines spurs and branches; or *iii*) 2 years after inoculation in 2-year-old rootstock Kober 5BB grafted with 'Italia'. No symptoms on leaves were induced. While *F. punctata* re-isolation was successful, no other wood degrading fungi were re-isolated. Sparapano *et al.* (2000a) concluded that *F. punctata* (probably *Fmed*) could act as a primary pathogen, and was able to colonize the grapevine woody tissues without other previous fungal infections when inoculated through wounds.

To gain details on the role of each fungus in "Esca disease", Sparapano *et al.* (2000b, 2001a) studied fungus-to-fungus and fungus-to-plant interactions, both *in vitro* and *in planta* co-inoculations. Sparapano *et al.* (2000b) showed *in vitro* competitive interaction of *F. punctata* (probably *Fmed*) with *P. chlamydospora* and antagonism between *P. aleophilum* (= *P. minimum*) and *F. punctata*. They also observed that each fungus could act as a primary pathogen by *in planta* inoculations. Moreover, the effect of *F. punctata* (probably *Fmed*) on the woody tissue of 'Italia' and 'Matilde' grapevines was limited by *P. aleophilum* (= *P. minimum*) but not by *P. chlamydospora*. Only *F. punctata* (probably *Fmed*) alone was able to induce white rot. This fungus was re-isolated, but no foliar symptoms were observed in the co-inoculation experiments. Besides confirming the fungus-to-fungus competitive and antagonistic interactions with *Pch* and *P. aleophilum* (= *P. minimum*), Sparapano *et al.* (2001a)

found that *F. punctata* causes wood discolouration followed by limited and localised white rot lesions within 3 years after single-inoculations or all possible co-inoculations, in 5-year-old 'Italia' and 9-year-old 'Matilde' vines, when they were inoculated in the spurs, spreading slightly more rapidly when trunks of plants were inoculated. Fungus re-isolation was always successful, and few foliar symptoms (even though not fully corresponding to the typical tiger stripe pattern) were observed after 2 to 3 years from inoculation in all the inoculation combinations. Non-inoculated plants (experimental controls) did not develop foliar symptoms.

The most recent study of *Fmed* pathogenicity was conducted by Amerloo *et al.* (2020). They inoculated *Fmed* mycelium on 2-year-old rooted grapevine 'Kolahdari' cutting under controlled greenhouse conditions, obtaining wood discolourations (but not white rot) 10 months after inoculation, confirming that white rot formed only on old wood. The proportion of *Fmed* re-isolation was approx. 60%, and no foliar symptoms were recorded. These results were in agreement with findings in rooted cuttings of 'Cabernet Sauvignon' (Laveau *et al.*, 2009), 1-year-old 'Macabeo' and 'Tempranillo' plants grafted onto Richter 110 rootstock (Luque *et al.*, 2009), and 1-year-old rooted plants of 'Sultana Seedless' (Akgül *et al.*, 2015).

Data from pathogenicity tests of *Fmed* and grapevine are still too scarce for postulation of general concepts, especially considering that multiple factors could play a role in wood symptoms appearance (i.e. grapevine cultivar, age, trunk portion). However, the experimental evidence on ability of the pathogen to primarily colonize grapevine wood, and on relationships between white rot presence/amount and external foliar symptoms, require further investigation, especially considering contrasting results obtained from artificial inoculations versus the ones obtained from curative experiments (see above).

Host specificity should also be considered. *Fmed* isolates from different hosts have been used for pathogenicity tests on citrus trees (Elena *et al.*, 2006). According to the extent of wood discolouration in citrus trees after inoculation with *Fmed* isolates from *Citrus*, *Vitis*, or *Actinidia*, a degree of host specificity for *Citrus* spp. was suggested. Other cross-pathogenicity tests conducted by Markakis *et al.* (2017) shown a certain degree of host-specificity in *Fmed*: grapevine-isolates inoculated in wood of pomegranate tree and kumquat tree shown shorter wood discoloration (and no fungal re-isolation) than in pathogenicity test with isolates from the same trees.

Study of host specificity for different *Fmed* isolates could elucidate dissemination modes for *Fmed*.

As indicated above, most wood and/or foliar vine symptoms could be caused by enzymes, toxins and/or other metabolites secreted by the pathogens individually or in combinations spreading through vines from the colonised wood, together with products of host defence reactions (Sparapano *et al.*, 1998; Graniti *et al.*, 1999; Mugnai *et al.*, 1999; Amalfitano *et al.*, 2000, 2011; Sparapano *et al.*, 2000a, 2000b; Bruno and Sparapano, 2006b; Claverie *et al.*, 2020). Recently, wood degradation in grapevine diseases was critically reviewed in comparison with other tree species by Schilling *et al.* (2021), reinforcing our observation that studying enzymatic and non-enzymatic fungal degradation, together with host defence related compounds, could be the key to understanding fungal adaptation to grapevine, and provide insights into wood and foliar symptoms.

Enzymes

White rot in wood is the result of lignin, cellulose, and hemicellulose degradation (either simultaneously or preferentially) by extracellular enzyme activity (Blanchette, 1991). These enzymes include: *i*) carbohydrate-active enzymes (CAZymes), such as endoglucanases (EC 3.2.14), cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91, classified in the Glycoside Hydrolase family, GH), β -glucosidases (EC 3.2.1.21) and cellobiose dehydrogenase, CDH (EC 1.1.99.18); *ii*) laccases (EC 1.10.3.2; p-diphenol:di-oxygen oxidoreductases); and *iii*) Class II peroxidases (PODs), such as manganese peroxidases (MnP; EC 1.11.1.13), lignin peroxidases (LiP; EC 1.11.1.14) and the versatile peroxidases (VPs, EC 1.11.1.16) (Daniel, 2014). Auxiliary activities (AA) redox enzymes are also considered to be present in white rot agents: eight families of ligninolytic enzymes and two of lytic polysaccharide mono-oxygenases (LPMOs) are associated with CAZymes and Class II PODs, since they may contribute jointly to degradation of polysaccharides (Levasseur *et al.*, 2013; Daniel, 2014). Carbohydrate-Binding Modules (CBMs) are non-catalytic modules which were also found to be associated with CAZymes, contributing to polysaccharide degradation activity (Boraston *et al.*, 2004). All these enzymes are currently collected for each fungus in the Carbohydrate Active Enzymes database (CAZy database, <https://www.cazy.org>), including its update for AA (<http://www.cazy.org/Auxiliary-Activities.html>) (Levasseur *et al.*, 2013; Lombard *et al.*, 2014).

Enzymes included in the pool of fungal secreted proteins, the secretome, can be involved in *Fmed* pathogenicity. *Fomitiporia mediterranea* and *F. punctata* (probably *Fmed*) secrete ligninolytic enzymes (such as laccases and peroxidases), and cellulolytic enzymes (such as endo-

1,4- β -glucanases and β -glucosidases), for which *in vitro* activities in *Fmed* cultures have been assessed (Mugnai *et al.*, 1999; Bruno and Sparapano 2006a). Laccases are known for their oxidase activity on a large set of phenolic compounds, and on non-phenolic compounds in the presence of mediators (Pérez *et al.*, 2002). However, the role of laccases in plant-pathogen interactions is still discussed. Their importance in pathogenicity has been suggested for some fungal species, such as the chestnut blight pathogen *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr, through tannin detoxification and involvement in several other metabolic pathways, such as fungal morphogenesis and pathogenesis (Singh Arora and Kumar Sharma, 2010). For *Fmed*, Abou-Mansour *et al.* (2009) purified a typical fungal 60kDa laccase from some isolates. This enzyme oxidizes many natural polyphenolic compounds. Complete lignin degradation was not achieved alone, however, but only with the contributions from ligninolytic class II PODs. Three manganese peroxidase genes supplementing laccase activity were characterized in the *Fmed* genome, as *Fmmnp1*, *Fmmnp2* and *Fmmnp3* (Morgenstern *et al.*, 2010). Cloete *et al.* (2015b) highlighted the LiP activity of *Fmed in vitro*. It therefore appears that *Fmed* produces a complete white rot-type enzymatic pool, capable of oxidizing and mineralizing lignin and polysaccharides. In addition, comparative genomic studies supported laboratory data and highlighted a rich enzymatic pool for *Fmed*. Floudas *et al.* (2012) and Riley *et al.* (2014) showed that *CDH* gene copies, several *GH* gene families, *LPMOs* and *CBM* family 1 (*CBM1*) genes were detected for the CAZymes pool. Other AAs were identified for lignin degradation pathways, including multicopper oxidases (MCO), copper radical oxidases (CRO), benzoquinone reductase, iron permease (FTR), and ferroxidase (Fet3) (Floudas *et al.*, 2012). The genes encoding for the latter five proteins have been described as genes involved in the non-enzymatic wood degradation caused by some brown rot pathogens (Sista Kameshwar and Qin, 2020). This could support the hypothesis that a similar non-enzymatic iron-dependent system (as described by Goodell *et al.*, 1997, for brown rot, and by Osti and Di Marco, 2010, for the *Pch* and *Pmin* soft rots) could also be part of the *Fmed* white rot process (Moretti *et al.*, 2019). Low Molecular Weight Compounds (LMWC) Fe^{3+} reductants could also be involved in generating OH radicals through a mediated Fenton reaction ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + \cdot OH$), as suggested in the Chelator Mediated Fenton (CMF) model proposed by Goodell *et al.* (1997). Three studies support this hypothesis, including: *i*) the *Fmed* draft genome revealed a homologous *SidA* gene responsible for inducing siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis* (DC.) Corda (Mei

et al., 1993; Floudas *et al.*, 2012; Canessa and Larrondo, 2013); *ii*) *F. punctata* (probably *Fmed*) produces LMW metabolites *in vitro*, some of which have iron-chelating ability (Sparapano *et al.*, 2000b; Di Marco *et al.*, 2001); and *iii*) the *Fmed* genome includes genes codifying for reducing-polyketide synthase (R-PKS) which upregulate in some brown rot fungi, and these have been related to LMWC production likely involved in the redox chemistry of non-enzymatic degradation models (Goodell *et al.*, 1997; Riley *et al.*, 2014; Goodell, 2020). These observations are in line with Riley *et al.* (2014), who observed that the lignocellulolytic gene pathway does not capture the prevailing paradigm of white rot/brown rot wood decay fungi over several *Basidiomycota* genomes. A more nuanced and less dichotomic categorization of rot types could be implemented.

The *Fmed* genome also includes several gene copies codifying for terpene synthase (TS), cytochrome P450 monooxygenase (CytP450) and glutathione transferases (GSTs) (Floudas *et al.*, 2012). Together with R-PKS, TS could confer competition advantages against other microorganisms through secondary metabolite production (Riley *et al.*, 2014). CytP450 could also be involved in secondary metabolite production, and was originally described with GSTs as part of fungal xenomes, often associated with intracellular detoxification processes against lignin and other secondary metabolites synthesized by plants in reaction to fungus attack (Morel *et al.*, 2013). This could confer the “primary” pathogen character reported by Sparapano *et al.* (2000a, 2001a).

Degradative enzymes (such as laccases, peroxidases and tannases) produced by *Fmed* could also degrade antimicrobial substances synthesized by host plants (tannic acid and resveratrol), playing putative roles in host-pathogen interactions. Moreover, detoxification enzymes such as phenol-oxidases and peroxidases were also detected in the contact zones of dual cultures with *Fmed* and *Pch* or *Fmed* and *Pmin*, suggesting detoxification activity by these enzymes against antimicrobial substances secreted by antagonistic fungi (Bruno and Sparapano, 2006a).

In conclusion, studying the complexity of the enzymatic pool, the secretome and xenome, together with possible presence of a non-enzymatic iron-dependent pathway, could provide further insight into *Fmed*-grapevine interactions and “Esca disease” symptomatology.

Phytotoxic compounds, organic acids, and other molecules

Toxin production and translocation to foliage via sap flow has been often proposed as the possible cause of “Esca disease” foliar symptoms (Claverie *et al.*, 2020),

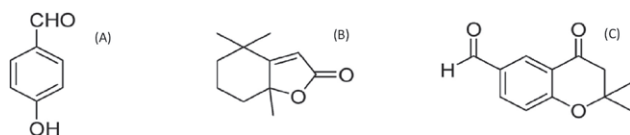


Figure 7. Phytotoxins produced by *Fomitiporia mediterranea*, based on relevant reports. (A), 4-Hydroxybenzaldehyde; (B), dihydroactinolide; (C), 6-Formyl-2,2-dimethyl-4-chromanone. Chemical formulae retrieved by PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

and its role in GTDs has recently been reviewed (Masi *et al.*, 2018). It has been postulated that an oxidative burst triggered by the toxins in leaves could be more likely involved in foliar symptoms appearance than toxins themselves (Calzarano and Di Marco, 2018b). Toxicity thresholds and possible interference with other foliar susceptibility factors are still unclarified (Claverie *et al.*, 2020). Production of low molecular weight metabolites with potential phytotoxicity was recorded (without identification) by Sparapano *et al.* (2000c), but phytotoxins were identified by Tabacchi *et al.* (2000) in *F. punctata* cultures (probably *Fmed*). They detected 4-hydroxybenzaldehyde, dihydroactinolide and 6-Formyl-2,2-dimethyl-4-chromanone (Figure 7), a phytotoxin related to eutypine produced by *Eutypa lata* (Deswarte *et al.*, 1996a, 1996b; Andolfi *et al.*, 2011). It was suggested that hydroxyl-benzaldehyde and its derivatives (carrying the aldehyde function) play important roles in the toxicity of fungi implicated in “Esca disease”. Phytotoxicity was reported only for 4-Hydroxy-benzaldehyde on living protoplasts from *V. vinifera* ‘Cabernet Sauvignon’ at 10^{-5} and 10^{-6} M, as well as on callus from *V. vinifera* ‘Gamay’ grown in media supplemented with different concentrations of the metabolite (100, 250, and 500 mM) (Tabacchi *et al.*, 2000). Further research is necessary to fully assess phytotoxicity of fungal metabolites and their roles in the diseases of Esca complex.

There is good correlation between fungus pathogenesis and oxalic acid secretion (Dutton and Evans, 1996). This is especially true for wood decay agents, where organic acids (mainly oxalic acid) may facilitate lignocellulosic biomass degradation, due to pH acidification, unstable and toxic divalent metal chelation, and H_2O_2 production (Kuan and Tien, 1993; Shimada *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1994; Urzúa *et al.*, 1998). Oxalic acid metabolism is mainly regulated by two enzymes, i.e. oxalate decarboxylase (ODC, EC 4.1.1.2) and oxalate oxidase (OXO, EC 1.2.3.4), both of which catabolize the organic acid and reduce its level, which in high concentrations could be cytotoxic for pathogenic fungi (Svedružić *et al.*, 2005; Zhuang *et al.*, 2015). For *F. punctata* (probably *Fmed*), despite pH lowering in liquid culture (from 6.8 to

5.3; Sparapano *et al.*, 2000c), Liaud *et al.* (2014) observed no organic acid production by *Fmed* in a comparative liquid culture chromatography screening. However, the presence of oxalate decarboxylase/oxidases gene copies in the *Fmed* genome (Floudas *et al.*, 2012) indicates that epigenetic regulation of their expression could often occur.

Basidiomycete species are well known to produce pigments in response to abiotic and biotic stimuli, and these pigments act as chemical mediators during interactions between multiple organisms. Among them, terpene polyketide and amino acid derivatives are known to be inducible, and to confer competition advantage (Spiteller, 2008, 2015; Halbwachs *et al.*, 2016). In co-culture assays with *Hapalopilus rutilans* (Pers.) Murrill, *Fmed* mycelium increased pigmentation earlier compared to axenic culture, via hyperproduction of hypholomine B (Tauber *et al.*, 2018), suggesting a role in interaction modulation. Interactions of *Fmed* with other microorganisms has been studied by Bruno and Sparapano (2006a) and Sparapano *et al.* (2000b, 2001b). In dual cultures with *Pmin* on modified Czapek medium, *Fmed* colony margins turned brown, became thicker and aerial hyphae formed ridge-like barriers, but the fungus growth stops at the contact zone. In dual cultures with *Pch*, after agonistic early growth, *Fmed* overgrew *Pch* mycelium (Sparapano *et al.*, 2000b). The *Pmin* vs *F. punctata* (probably *Fmed*) antagonistic effect was confirmed in triple cultures with *Pch* in that condition, *Pch* was not overgrown by the *Fmed* mycelium, suggesting a suppressive role of *Pmin* (Sparapano *et al.*, 2000b). Sparapano *et al.* (2001b) also studied the possible biochemical motivation of these agonistic and not-agonistic effects: *Pmin* and *Pch* culture filtrates, depending on their dilution in culture media, inhibited or reduced growth of *F. punctata* in Malt Extract Agar (ME). No inhibition of *Fmed* in ME medium was observed for *Pmin* or *Pch* crude organic extracts (ethyl acetate extraction of culture filtrates), purified scytalone from *Pmin* and *Pch* (at 1 mg mL^{-1}), pullulan from *Pch* (at 0.2 mg mL^{-1}) and oligosaccharides up to 2.5 kDa obtained by digestion of *Pch*-pullulan (2 mg mL^{-1}) (Sparapano *et al.*, 2001b).

Study of the metabolome and transcriptome of the contact zones of different dual cultures to assess molecular cross-talking between *Fmed* and its competitor, would be worthwhile, to complete the partially studied secretome of this pathogen (Bruno and Sparapano, 2006a).

HOST PHYSIOLOGY CHANGES AND DEFENSE RESPONSES FOLLOWING *F. MEDITERRANEA* INFECTIONS

Data is sparse on changes in grapevine physiology and defence mechanisms specifically related to *Fmed*.

Effects of GTDs on grapevine physiology were reviewed by Fontaine *et al.* (2016b), but no specific responses to *Fmed* colonization and infection have been reported. Nevertheless, research on re-established plant vigour and quality grape production after 3 years from curettage treatments (see below) has demonstrated that white rot (where the main European decay agent *Fmed* is overabundant; Fischer and Kassemeyer, 2003; Bruez *et al.*, 2017) probably affects grapevine physiology (Chollet *et al.*, 2021). This follows observations by Ouadi *et al.* (2019) on ‘Cabernet Sauvignon’ plants presenting foliar symptoms of “Esca disease”. They linked the abundance of necrotic wood (mainly white rot) in grapevine trunks and cordons with a 30% reduction in vine sap flow circulation, and thus leaf transpiration.

Few experiments have been performed to clarify plant defence mechanisms against *Fmed*. In callus/fungus dual culture experiments, Bruno and Sparapano (2006c) identified a number of phenolic molecules (benzaldehyde derivatives, benzoic acid derivatives, flavonols, flavonol-3-o glycosides, quercetin 3-rhamnoside, catechins and stilbenes) that were differentially induced in ‘Matilde’ and ‘Italia’ grapevines. Other studies have focused directly on vine sap (Bruno and Sparapano, 2006b, d) or brown-red symptomatic wood (Amalfitano *et al.*, 2000, 2011; Agrelli *et al.*, 2009) of “Esca disease”-symptomatic plants. Several stilbene-phenolic molecules were identified, which are theoretically toxic to *Fmed*, that showed greater sensitivity to phenols than *Pch* or *Pmin* (Amalfitano *et al.*, 2001, 2011). Similar results were obtained by Rusjan *et al.* (2017) in wood of leaf stripe symptomatic vines, but with phenolic alterations reflecting both presence of the pathogen and wood condition in different parts of vines (trunks and rootstocks). Rusjan *et al.* (2017) proposed a relationship between the period of presence of the pathogen in different vine portions and their phenolic profiles. However, biomolecule concentration increases observed by Rusjan *et al.* (2017) may not be related exclusively to *Fmed*. Diseased plants are naturally infected by all the “Esca disease”-related fungi (*Pch*, *Pmin*, *Fmed*), and other possible microbial consortia highlighted by metagenomic approaches. Nevertheless, because a *Fmed*-*Pch*-*Pmin* interaction has been demonstrated, a relationship is likely between those compounds and *Fmed* (Sparapano *et al.*, 2001b; Bruez *et al.*, 2020). For this reason, results from most metabolomic studies in leaves responding to “Esca disease”-associated pathogens should be treated with caution, when attempting to understand exact plant responses to *Fmed* (Goufo *et al.*, 2019; Moret *et al.*, 2021). Further studies are necessary to precisely determine grapevine metabolite production burst specifically in response to *Fmed* colonization.

Damage to host hydraulic systems caused by the white rot necrosis could be the most important driver of physiological effects in grapevines, but specific studies are necessary to verify these hypotheses. To the best of our knowledge there have been no reported studies of wood compartmentalization specifically towards *Fmed*. The metabolic changes induced by *Fmed in planta* could generate biochemical markers for presence of the pathogen and wood degrading activity.

CONTROL STRATEGIES WITH A FOCUS ON *F. MEDITERRANEA*

Effective disease management is a major challenge in crop protection, and particularly for disease complexes such as “Esca disease”. Efficiency of individual control methods for Esca complex of diseases is limited, and is best managed using integrated disease management, from nursery to vineyard. This includes cultural or remedial practices, vineyard sanitation, and use of pesticide chemicals or biological agents to protect grapevine wounds from pathogen infections (Gramaje *et al.*, 2018). Methods to reduce or limit disease incidence, especially against *Fmed* infection, are outlined below.

Disease resistance

Incidence of “Esca disease” symptoms have been reported as cultivar-, rootstock-, and clone-related (Marchi 2001; Fussler *et al.*, 2008; Grosman, 2008; Murolo and Romanazzi, 2014; Guan *et al.*, 2016; Kraus *et al.*, 2019; Moret *et al.*, 2019), but they were all related to reduced presence of leaf symptoms, not to wood decay development. Some hypotheses could explain cultivar differences. Rolshausen *et al.* (2008) reported greater lignin levels in ‘Merlot’ grapevines tolerant to *E. lata* compared to susceptible ‘Cabernet-Sauvignon’ vines. A similar correlation has been suggested for *Fmed* affecting different olive tree varieties (Markakis *et al.*, 2019). Assessment of susceptibility of wild grapevine (*V. vinifera* subsp. *sylvestris*) to *Fmed* could be worthwhile, because this host has been shown to be a promising potential source of resistance to *Botryosphaeria dieback* (Guan *et al.*, 2016). Some data are available on other *Vitis* genotypes used in resistance source trials (Kraus *et al.*, 2019). Fischer (2019) also detected regular presence of *Fmed* vegetative mycelium in rootstock mother blocks of rootstocks SO4, 5BB and 125AA in Germany, all of which were a cross population of *Vitis berlandieri* × *Vitis rupestris*.

Grapevine propagation material

The use of a good quality pathogen-free plant material is essential to limit inoculum propagation. Although *Fmed* has been shown to be present in blocks of rootstock mother vines (Fischer, 2009, 2019), and thus the derived plant material could be infected by “Esca disease”-associated fungi before nursery stages or during the propagation processes, *Fmed* has never been isolated from grafted 1-year old cuttings or propagation material. Furthermore, this pathogen has not been reported in grapevine nurseries (Larignon and Dubos 2000; Halleen *et al.*, 2003; Zanzotto *et al.*, 2007; Larignon *et al.*, 2008a; Aroca *et al.*, 2010; Gramaje and Armengol, 2011; Fischer, personal communication).

Protective and curative disease control methods

Curative control

Removing white rot from diseased grapevines seems to be efficient for reducing leaf stripe symptoms. This old technique, called “curettage” or “trunk surgery”, consists of cutting affected vines and removing white rot with small precision chain saws. It provides good results; foliar symptoms are reduced even several years after curetting (Thibault, 2015). Cholet *et al.* (2021) demonstrated how curettage in “Esca disease”-symptomatic plants reduced foliar symptoms during 3 years after treatment, and re-establish vine vigour and grape production. Pacetti *et al.* (2021) confirmed foliar symptom remission in 14-year-old GLSD symptomatic ‘Cabernet Sauvignon’ vines for the following 2 years after complete trunk surgery, and demonstrated microbiome change induced by the treatment. *Fomitiporia mediterranea* abundance decreased after curettage, in parallel to an alpha-diversity increase in fungal population, suggesting a microbiota shift as a likely explanation for foliar symptom reduction during the post-curettage period.

Plant endotherapy is another promising curative technique against white rot. This includes direct treatment of white rot by drilling a vertical hole in grapevine trunks and injecting specific molecule solutions (typically fungicides), aiming to reduce foliar symptoms. However, due to the complexity of microbial consortia in diseased trunks, and because of the wood peculiar structure in old cultivated vines, specificity of the technique against *Fmed* needs to be refined. This approach is the subject of ongoing research (Gellon *et al.*, 2017; Pacetti *et al.*, 2019).

Sodium arsenite has been used in viticulture for a long time as the only effective and curative treatment

against “Esca disease” (Songy *et al.*, 2019b), and studies on modes of action of this compound are increasing. Larignon *et al.* (2008b) suggested *Fmed* as the most sodium arsenite sensitive “Esca disease”-associated fungus, and when Goddard *et al.* (2017) investigated the fate of arsenite within “Esca-diseased” treated plants, they found it concentrated in white rot necroses. Bruez *et al.* (2017) demonstrated that *Fmed* isolations were reduced from white rot necrotic tissue coming from sodium arsenite treated plants. Bruez *et al.* (2021) showed how in sodium arsenite treated ‘Gewürztraminer’, ‘Chardonnay’ and ‘Merlot’ vines (25 to 40 years old) expressing tiger stripe symptoms, the relative abundance of *Fmed* decreased in white rot necroses and necrosis boundaries, confirming *Fmed* as the most sodium arsenite sensitive among GTDs-associated fungi (Larignon *et al.*, 2008b). Previously foliar symptomatic plants did not express these symptoms after treatment, suggesting that the positive effect of sodium arsenite on GLSD was from specific toxicity to *Fmed* in white rot necrotic tissues and their boundaries, where other parasitic and saprobic fungi (*Inonotus hispidus* Bull. P. Karst., *Lepiota brunneoincarnata* Chodat & C. Martín) took place, increasing their relative abundance (Bruez *et al.*, 2021).

Except for host endotherapy, for which experiments are ongoing, up to now curettage is likely to be the most sustainable physical management method against *Fmed*. More user- and environmentally-friendly chemical curative alternative should be proposed. The long-term efficacy of curative treatments has not been fully assessed. Data on reduction of foliar stripe symptoms provided by these two curative techniques (curettage and sodium arsenite) reinforce the link between GLSD and white rot, suggesting that more studies are required on these disease management approaches.

Preventive control

Protection of grapevine pruning wounds is an essential point to reduce pathogen entry (Eskalen and Gubler, 2001; Eskalen *et al.*, 2007). In some European countries, some pesticide products (based on boscalid or pyraclostrobin) and biocontrol products (based on specific strains of *Trichoderma* spp.) are available for protection against GTDs. However, research with these products for management of *Fmed* diseases has not been reported yet.

Beside the authorized and registered products containing boscalid, pyraclostrobin or *Trichoderma* spp., many products or molecules have been tested *in vitro* for the control of GTD pathogens, and these were reviewed by Gramaje *et al.* (2018) and Mondello *et al.* (2018b). For *Fmed*, however, only few reports are available. Chitosan

in *in vitro* tests gave a low EC₅₀ value (1.53 mg L⁻¹) for *Fmed* (Nascimento *et al.*, 2007). Sensitivity of *Fomitiporia* spp. to chitosan was first reported by Bruno *et al.* (2001). Incorporation of resveratrol in culture media gave a direct antifungal effect against *Fmed* growth (Mazzullo *et al.*, 2000). Copper oxychloride and gluconate formulations slightly reduced *Fmed* mycelium growth *in vitro*, with an EC₅₀ of 11.242 mg Cu L⁻¹ (Di Marco *et al.*, 2011). For biological control, sensitivity of *Fmed* to crude protein extracts (CPE) from *Bacillus amiloliquefaciens* AG1 has been recorded as 2.000 AU mL⁻¹ (Alfonzo *et al.*, 2012). Del Frari *et al.* (2019b) demonstrated with *in vitro* dual culture plates that growth of *Fmed* and other “Esca disease”-associated fungi was inhibited by *Epicoccum* spp., a member of ascomycetes which have been commonly identified in grapevine microbiomes. No clear data have been provided about effects of *Trichoderma* spp. on *Fmed*, in contrast to documented effects of these fungi on the growth of *Pch* and *E. lata* (Di Marco *et al.*, 2004b; John *et al.*, 2005).

CONCLUSIONS AND FUTURE PERSPECTIVES

We have made careful attempts to collect and review all relevant published information on *F. mediterranea*, to stimulate debate within the GTD scientific community. Approximately 20 years after formal classification of this fungus, it is well established that it induces white rot in the grapevine wood, but details of the relationships between *Fmed* and GLSD essentially remain unknown. The causes and biomolecular mechanisms of white rot, and their relationships with external grapevine foliar symptoms, has yet to be deciphered, especially in light of knowledge and observations reviewed here. To fully describe these processes could be a standing point in the context of GTDs, and will allow viticulture to adopt new solutions for management of grapevine trunk diseases.

LITERATURE CITED

- Abbatecola A., Dongiovanni C., Faretra F., Pollastro S., 2000. Observations on the fungi associated with Esca and on spatial distribution of Esca-symptomatic plants in Apulian (Italy) vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 206–210.
- Abou-Mansour E., Couché E., Tabacchi R., 2004. Do fungal naphthalenones have a role in the development of esca symptoms? *Phytopathologia Mediterranea* 43: 75–82.
- Abou-Mansour E., Polier J., Pezet R., Tabacchi R., 2009. Purification and partial characterisation of a 60 KDa
- laccase from *Fomitiporia mediterranea*. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 447–453.
- Agrelli D., Amalfitano C., Conte P., Mugnai L., 2009. Chemical and spectroscopic characteristics of the wood of *Vitis vinifera* cv. Sangiovese affected by esca disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(24): 11469–11475.
- Ahmadyusefi Sarhadi F., Mohammadi H., 2019. *Fomitiporia mediterranea* and *Phaeoacremonium rubrigenum* associated to Russian olive trunk diseases in Iran. 4th Iranian Mycological Congress, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. 26–28 August 2019: 104 (Abstract).
- Akgül D.S., Gungor Savas N., Teker T., Keykubat B., Mayorquin J.S., Eskalen A., 2015. Fungal trunk pathogens of Sultana seedless vineyards in Aegean region of Turkey. *Phytopathologia Mediterranea* 54(2): 380–393.
- Alfonzo A., Lo Piccolo S., Conigliaro G., Ventorino V., Burrano S., Moschetti G., 2012. Antifungal peptides produced by *Bacillus amiloliquefaciens* AG1 active against grapevine fungal pathogens. *Annals of Microbiology* 62: 1593–1599.
- Amalfitano C., Evidente A., Surico G., Tegli S., Bertelli E., Mugnai L., 2000. Phenols and stilbene polyphenols in the wood of esca-diseased grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 39(1): 178–183.
- Amalfitano C., Agrelli D., Arrigo A., Mugnai L., Surico G., Evidente A., 2011. Stilbene polyphenols in the brown red wood of *Vitis vinifera* cv. Sangiovese affected by “esca proper”. *Phytopathologia Mediterranea* 50: S224–S235.
- Amarloo O.A., Mohammadi H., Mahdian S.A., Tajick Ghanbary M.A., 2020. Identification and pathogenicity of fungal species associated with grapevine trunk diseases in Khorasan–Razavi province, Iran. *Mycologia Iranica* 7(1): 83–94.
- Andolfi A., Mugnai L., Luque J., Surico G., Cimmino A., Evidente A., 2011. Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. *Toxins* 3(12): 1569–1605.
- Armengol J., Vicent A., Torné L., García-Figueres F., García-Jiménez J., 2001. Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey. *Phytopathologia Mediterranea* 40(3): 325–329.
- Aroca Á., Gramaje D., Armengol J., García-Jiménez J., Raposo R., 2010. Evaluation of the grapevine nursery propagation process as a source of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeoacremonium chlamydospora* and occurrence of trunk disease pathogens in rootstock mother vines in Spain. *European Journal of Plant Pathology* 126: 165–174.

- Baranek M., Armengol J., Holleinova V., Pecenka J., Calzarano F., ... Eichmeier A., 2018. Incidence of symptoms and fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Czech vineyards: first example from a north-eastern European grape-growing region. *Phytopathologia Mediterranea* 57(3): 449–458.
- Beck H.E., Zimmermann N.E., McVicar T.R., Vergopolan N., Berg A., Wood E.F., 2018. Present and future Köppen-Geiger climate classification maps at 1-km resolution. *Nature Scientific Data* 5: 180214.
- Berraf A., Péros J.P., 2005. Importance of Eutypa dieback and esca in Algeria and structure of the associated fungal community. (Importance de l'eutypiose et de l'esca en Algérie et structure de la communauté fongique associée.). *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 39(3): 121–128.
- Bertsch C., Ramírez-Suero M., Magnin-Robert M., Larignon P., Chong J., ... Fontaine F., 2013. Grapevine trunk diseases: Complex and still poorly understood. *Plant Pathology* 62(2): 243–265.
- Bester M.C., Halleen F., Mostert L. 2015. A PCR detection system for South African basidiomycetous isolates from esca affected grapevine. *Australasian Plant Pathology* 44: 647–651.
- Blanchette R., 1991. Delignification by wood-decay fungi. *Annual Review of Phytopathology* 29: 381–398.
- Bonnet L.O., 1926. A promising remedy for black measles of the vine. In: *College of Agriculture. Agricultural Experiment Station*, University of California, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station, Berkeley, CA, USA, Circular 303, 10 p.
- Boraston A.B., Bolam D.N., Gilbert H.J., Davies G.J., 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochemical Journal* 382 (Pt 3): 769–781.
- Bortolami G., Gambetta G.A., Delzon S., Lamarque L.J., Pouzoulet J., ... Delmas C.E.L., 2019. Exploring the hydraulic failure hypothesis of esca leaf symptom formation. *Plant Physiology* 181: 1163–1174.
- Bortolami G., Farolfi E., Badel E., Burlett R., Cochard H., ... Delmas C.E.L., 2021. Seasonal and long-term consequences of esca grapevine disease on stem xylem integrity. *Journal of Experimental Botany* 72(10): 3914–3928.
- Brown A. A. A., Lawrence D. P. P., Baumgartner K., 2020. Role of basidiomycete fungi in the grapevine trunk disease esca. *Plant Pathology* 69(2): 205–220.
- Bruez E., Lecomte P., Grosman J., Doublet B., Bertsch C., ... Rey P., 2013. Overview of grapevine trunk diseases in France in the 2000s. *Phytopathologia Mediterranea* 52(2): 262–275.
- Bruez E., Vallance J., Gerbore J., Lecomte P., Da Costa J. P., ... Rey P., 2014. Analyses of the temporal dynamics of fungal communities colonizing the healthy wood tissues of esca leaf-symptomatic and asymptomatic vines. *PLoS ONE* 9(5): e95928.
- Bruez E., Larignon P., Bertsch C., Rey P., Fontaine F., 2017. Comparison of the wood-microbiome from Grapevine Trunk Disease-plants, treated or not with sodium arsenite. *Phytopathologia Mediterranea* 56(3): 560–561 (Abstract).
- Bruez E., Vallance J., Gautier A., Laval V., Compant S., ... Rey P., 2020. Major changes in grapevine wood microbiota are associated with the onset of esca, a devastating trunk disease. *Environmental Microbiology* 22(12): 5189–5206.
- Bruez E., Larignon P., Bertsch C., Robert-Siegwald G., Lebrun M.-H., ... Fontaine F., 2021. Impacts of sodium arsenite on wood microbiota of esca-diseased grapevines. *Journal of Fungi* 7: 498.
- Bruno G., Muzzarelli R.A.A., Muzzarelli C., Sparapano L., 2001. Biological activity of chitosan and its derivatives on plant pathogenic or antagonistic fungi and on host plants. In: *Proceedings of the 11th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union and 3rd Congress of the Sociedade Portuguesa de Fitopatologia*, 17–20 September 2001, University of Évora, Évora, Portugal, 104–106.
- Bruno G., Sparapano L., 2006a. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: III. Enzymes produced by the pathogens and their role in fungus-to-plant or in fungus-to-fungus Interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69: 182–194.
- Bruno G., Sparapano L., 2006b. 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* 69: 195–208.
- Bruno G., Sparapano L., 2006c. 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* 69: 209–223.
- Bruno G., Sparapano L., 2006d. 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* 71: 210–29.
- Calzarano F., Cichelli A., Odoardi M., 2001. Preliminary evaluation of variations in composition induced by esca on cv. Trebbiano d'Abruzzo grapes and wines. *Phytopathologia Mediterranea* 40: 443–448.

- Calzarano F., Di Marco S., 2007. Wood discoloration and decay in grapevines with esca proper and their relationship with foliar symptoms. *Phytopathologia Mediterranea* 46: 96–101.
- Calzarano F., Amalfitano C., Seghetti L., Cozzolino V., 2009. Nutritional status of vines affected with esca proper. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 20–31.
- Calzarano F., Osti F., D'agostino V., Pepe A., Di Marco S., 2017. Mixture of calcium, magnesium and seaweed affects leaf phytoalexin contents and grape ripening on vines with grapevine leaf stripe disease. *Phytopathologia Mediterranea* 56(3): 445–457.
- Calzarano F., Osti F., Baránek M., Di Marco S., 2018a. Rainfall and temperature influence expression of foliar symptoms of grapevine leaf stripe disease (esca complex) in vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* 57(3): 488–505.
- Calzarano F., Di Marco S., 2018b. Further evidence that calcium, magnesium and seaweed mixtures reduce grapevine leaf stripe symptoms and increase grape yields. *Phytopathologia Mediterranea* 57: 459–471.
- Calzarano F., Pagnani G., Pisante M., Bellocchi M., Cillo G., ... Di Marco, S., 2021. Factors involved on tiger-stripe foliar symptom expression of esca of grapevine. *Plants* 10(6): 1041.
- Carlucci A., Raimondo M.L., Cibelli F., Phillips A.J.L., Lops F., 2013. *Pleurostomophora richardsiae*, *Neofusicoccum parvum* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with a decline of olives in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 52(3): 517–527.
- Canessa P., Larrondo L.F., 2013. Environmental responses and the control of iron homeostasis in fungal systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 939–955.
- Castanera R., Borgognone A., Pisabarro A.G., Ramírez L., 2017. Biology, dynamics, and applications of transposable elements in basidiomycete fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101: 1337–1350.
- Castillo J.A., Plata G., 2016. The expansion of brown rot disease throughout Bolivia: possible role of climate change. *Canadian Journal of Microbiology* 62: 442–448.
- Chen H., Cui B.K., 2017. Multi-locus phylogeny and morphology reveal five new species of *Fomitiporia* (Hymenochaetaceae) from China. *Mycological Progress* 16(7): 687–701.
- Chen J.J., Wu Y.D., Ji X.H., Gates G., Xu X., 2021. A new species of *Fomitiporia* (Hymenochaetales) from Australia. *Phytotaxa* 489(2): 200–208.
- Chiarappa L., 1997. *Phellinus igniarius*: the cause of spongy wood decay of black measles (“esca”) disease of grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 36: 109–111.
- Cholet C., Bruez E., Lecomte P., Rey P., Boury T., ... Geny-Denis L., 2019. Intérêt du curetage dans la lutte contre l'esca. *Phytoma* 728: 24–27.
- Cholet C., Bruez E., Lecomte P., Barsacq A., Martignon T., ... Gény L., (2021). Plant resilience and physiological modifications induced by curettage of Esca-diseased grapevines. *OENO One* 55(1): 153–169.
- Choueiri E., Jreijiri F., Chlela P., Mayet V., Comont G., ... Lecomte P., 2014. Fungal community associated with grapevine wood lesions in Lebanon. *OENO One* 48(4): 293–302.
- Ciccarone C., Graniti A., Schiaffino A., Marras F., 2004. Molecular analysis of *Fomitiporia mediterranea* isolates from esca-affected grapevines in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 43: 268–272.
- Claverie M., Notaro M., Fontaine F., Wéry J., 2020. Current knowledge on Grapevine Trunk Diseases with complex etiology: a systemic approach. *Phytopathologia Mediterranea* 59(1): 29–53.
- Cloete M., Fischer M., Mostert L., Halleen F., 2014. A novel *Fomitiporia* species associated with esca on grapevine in South Africa. *Mycological Progress* 13: 303–311.
- Cloete M., Fischer M., Mostert L., Halleen F., 2015a. Hymenochaetales associated with esca-related wood rots on grapevine with a special emphasis on the status of esca in South African vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* 54(2): 299–312.
- Cloete M., Mostert L., Fischer M., Halleen F., 2015b. Pathogenicity of South African Hymenochaetales taxa isolated from esca-infected grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 54(2): 368–379.
- Cloete M., Fischer M., Du Plessis I.L., Mostert L., Halleen F., 2016. A new species of *Phellinus* sensu stricto associated with esca on grapevine in South Africa. *Mycological Progress* 15(25): 1–9.
- Cortesi P., Fischer M., Milgroom M.G., 2000. Identification and spread of *Fomitiporia punctata* associated with wood decay of grapevine showing symptoms of esca. *Phytopathology* 90(9): 967–972.
- Crous P.W., Gams W., 2000. *Phaeoconiella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 112–118.
- Dai Y.C., Cui B.K., Decock C., 2008 A new species of *Fomitiporia* (Hymenochaetaceae, Basidiomycota) from China based on morphological and molecular characters. *Mycological Research* 112(3): 375–80.
- Daniel G., 2014. Fungal and Bacterial Biodegradation: White Rots, Brown Rots, Soft Rots, and Bacteria. In: *Deterioration and Protection of Sustainable Biomaterials* (T.P. Schultz, B. Goodell, D.D. Nicholas, ed.), American Chemical Society, Washington DC, 23–58.

- Decock C., Figueroa S.H., Robledo G., Castillo G., 2007. *Fomitiporia punctata* (Basidiomycota, Hymenochaetales) and its presumed taxonomic synonyms in America: taxonomy and phylogeny of some species from tropical/subtropical areas. *Mycologia* 99: 733–752.
- Del Frari G., Gobbi A., Aggerbeck M.R., Oliveira H., Hansen L.H., Ferreira R.B., 2019a. 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* 10: 910.
- Del Frari G., Cabral A., Nascimento T., Boavida Ferreira R., Oliveira H., 2019b. *Epicoccum layuense* a potential biological control agent of esca-associated fungi in grapevine. *PLoS ONE* 14(3): e0213273.
- Del Rivero J.M., García-Marí F., 1984. Ensayo de productos contra la yesca de la vid y la piral de la vid en tratamientos de invierno. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas* 10: 17–30.
- Deswarte C., Eychenne J., Davy de Virville J., Roustan J., Moreau F., Fallot J., 1996a. Protonophoric activity of eutypine, a toxin from *Eutypa lata*, in plant mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 334: 200–205.
- Deswarte C., Canut H., Kläebe A., Roustain J.P., Fallot J., 1996b. Transport, cytoplasmic accumulation, and mechanism of action of the toxic eutypine in *Vitis vinifera* cells. *Journal of Plant Pathology* 149: 336–342.
- Di Marco S., Osti F., Mazzullo A., Cesari A., 2001. How iron could be involved in esca fungi development. *Phytopathologia mediterranea* 40: 449–452.
- Di Marco S., Calzarano F., Osti F., Mazzullo A., 2004a. Pathogenicity of fungi associated with a decay of kiwifruit. *Australasian Plant Pathology* 33: 337–342.
- Di Marco S., Osti F., Cesari A., 2004b. Experiments on the control of esca by *Trichoderma*. *Phytopathologia Mediterranea* 43(1): 108–115.
- Di Marco S., Osti F., 2008. Foliar symptom expression of wood decay in *Actinidia deliciosa* in relation to environmental factors. *Plant Disease* 92 (8): 1150–1157.
- Di Marco S., Osti F., Mugnai L., 2011. First studies on the potential of a copper formulation for the control of leaf stripe disease within esca complex in grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 50: S300–S309.
- Diaz G.A., Auger J., Besoain X., Bordeu E., Latorre B.A., 2013. Prevalence and pathogenicity of fungi associated with grapevine trunk disease in Chilean vineyards. *Ciencia e Investigación Agraria* 40(2): 327–339.
- Dietzel K., Valle D., Fierer N., U'Ren J.M., Barberan A., 2019. Geographical distribution of fungal plant pathogens in dust across the United States. *Frontiers in Ecology and Evolution* 7: 304.
- Dutton M., Evans C.S., 1996. Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 881–895.
- Edwards J., Marchi G., Pascoe I.G., 2001. Young esca in Australia. *Phytopathologia Mediterranea* 40: 303–310.
- Elena K., Paplomatas E.J., 2002. First report of *Fomitiporia punctata* infecting Kiwi fruit. *Plant Disease* 86: 1176.
- Elena K., Fischer M., Dimou D., Dimou D.M., 2006. *Fomitiporia mediterranea* infecting citrus trees in Greece. *Phytopathologia Mediterranea* 45(1): 35–39.
- Elena G., Bruetz E., Rey P., Luque J., 2018. Microbiota of grapevine woody tissues with or without esca-foliar symptoms in northeast Spain. *Phytopathologia Mediterranea* 57: 425–438.
- Eskalen A., Gubler W.D., 2001. Association of spores of *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium inflatipes*, and *Pm. aleophilum* with grapevine cordons in California. *Phytopathologia Mediterranea* 40: 429–431.
- Eskalen A., Feliciano J., Gubler W.D., 2007. Susceptibility of grapevine pruning wounds and symptom development in response to infection by *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoconiella chlamydospora*. *Plant Disease* 91(9): 1100–1104.
- Farashiyani A., Mousavi Jorf S., Karimi M., 2012. Study of esca disease of grapevine in bojnourd. *Iranian Journal of plant pathology* 48: 143–153.
- Fiasson J.L., Niemelä T., 1984. The Hymenochaetales: a revision of the European poroid taxa. *Karstenia* 24(1): 14–28.
- Fischer M., 1987. Biosystematische Untersuchungen an den Porlingsgattungen *Phellinus* Quél. und *Inonotus* Karst. *Bibliotheca Mycologica* 107: 1–133.
- Fischer M., 1996. On the species complexes within *Phellinus*: *Fomitiporia* revisited. *Mycological Research* 100: 1459–1467.
- Fischer M., 2002. A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). *Mycological Progress* 1(3): 315–324.
- Fischer M., Kassemeyer H.H., 2003. Fungi associated with Esca disease of grapevine in Germany. *Vitis* 42(3): 109–116.
- Fischer M., Binder M., 2004. Species recognition, geographic distribution and host-pathogen relationships: A case study in a group of lignicolous basidiomycetes, *Phellinus* s.l. *Mycologia* 96(4): 799–811.
- Fischer M., Edwards J., Cunnington J.H., Pascoe I.G., 2005. Basidiomycetous pathogens on grapevine: a new species from Australia - *Fomitiporia australiensis*. *Mycotaxon* 91: 85–96.

- Fischer M., 2006. Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine: A worldwide perspective. *Phytopathologia Mediterranea* 45(4): 30–42.
- Fischer M., 2009. Nischengebundene Sippenbildung bei Holz bewohnenden Pilzen – experimentelle Befunde. In: *Bayer. Akademie der Wissenschaften (Hrsg.): Ökologische Rolle von Pilzen. Rundgespräche der Kommission für Ökologie*, 37. Pfeil, München, Germany, 53–62.
- Fischer M., 2012. Ein Basidiomycet als Neubürger: Vorkommen und Ausbreitung von *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales) in den badischen Weinbaugebieten, mit Hinweisen zum Vorkommen in Deutschland. *Andrias* 19: 229–236.
- Fischer M., González-García V., 2015. An annotated checklist of European basidiomycetes related to white rot of grapevine (*Vitis vinifera*). *Phytopathologia Mediterranea* 54(2): 281–298.
- Fischer M., Peighami-Ashnaei S., 2019. Grapevine, esca complex, and environment: The disease triangle. *Phytopathologia Mediterranea* 58(1): 17–37.
- Fischer M., 2019. Grapevine trunk diseases in German viticulture. III. Biodiversity and spatial distribution of fungal pathogens in rootstock mother plants and possible relation to leaf symptoms. *Vitis: Journal of Grapevine Research* 58(4): 141–149.
- Floudas D., Binder M., Riley R., Barry K., Blanchette R.A., ... Hibbett D.S., 2012. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* 336: 1715–1719.
- Fontaine F., Gramaje D., Armengol J., Smart R., Nagy Z.A., ... Corio-Costet, M.F., 2016a. *Grapevine trunk diseases: a review*. 1st ed. OIV Publications, Paris, France, 24p.
- Fontaine F., Pinto C., Vallet J., Clément C., Gomes A.C., Spagnolo A., 2016b. The effects of grapevine trunk diseases (GTDs) on vine physiology. *European Journal of Plant Pathology* 144(4): 707–721.
- Fussler L., Kobes N., Bertrand F., Maumy M., Grosman J., Savary S., 2008. A characterization of grapevine trunk diseases in France from data generated by the National Grapevine Wood Diseases Survey. *Phytopathology* 98(5): 571–579.
- García Benavides P., Martín Zamorano P., Ocete Pérez C.A., Maistrello L., Ocete Rubio R., 2013. Biodiversity of pathogenic wood fungi isolated from *Xylotrechus arvicola* (Olivier) galleries in vine shoots. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 47: 73–81.
- Gard M., 1922. L'Apoplexie de la Vigne et les formes résupinées du *Fomes igniarius* (L.) Fries. *Bulletin de la Société de pathologie végétale de France IX* (1) (séances de Janvier) 22–28.
- Gatica M., Césari C., Escoriaza G., 2004. *Phellinus* species inducing hoja de malvón symptoms on leaves and wood decay in mature field-grown grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 43: 59–65.
- Gellon M., Fuchs J., Farine S., Mazet F., Laloue H., ... Bertsch C., 2017. A new mode of treatment to cure GTDs: vegetal endotherapy? *Phytopathologia Mediterranea* 56(3): 572–573 (Abstract).
- Girometta C.E., Bernicchia A., Baiguera R.M., Bracco, F., Buratti S., ... Savino E., 2020. An Italian research culture collection of wood decay fungi. *Diversity* 12(2): 58.
- Goddard M.L., Boos A., Larignon P., Fontaine F., Bertsch C., Tarnus C., 2017. Arsenite experiments in the program CASDAR V1301 - Arsenic speciation in grapevines and impact on fungal population. *Phytopathologia Mediterranea* 56(3): 573–574 (Abstract).
- Goodell B., Jellison J., Liu J., Daniel G., Paszczynski A., ... Xu G., 1997. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. *Journal of Biotechnology* 53: 133–162.
- Goodell B., 2020. Fungi Involved in the Biodeterioration and Bioconversion of Lignocellulose Substrates. In: *The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research) vol 2. Genetics and Biotechnology* (Benz J.P., Schipper K., eds.), Springer, Cham, Switzerland, 369–397.
- Goufo P., Marques A. C., Cortez I., 2019. Exhibition of local but not systemic induced phenolic defenses in *Vitis vinifera* L. affected by brown wood streaking, grapevine leaf stripe, and apoplexy (esca complex). *Plants* 8(10): 412.
- Gramaje D., Armengol J., 2011. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant Disease* 95(9): 1040–1055.
- Gramaje D., Mostert L., Groenewald J.Z., Crous P.W., 2015. *Phaeoacremonium*: From esca disease to phaeohyphomycosis. *Fungal Biology* 119(9): 759–783.
- Gramaje D., Urbez-Torres J.R., Sosnowski M.R., 2018. Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: Current strategies and future prospects. *Plant Disease* 102(1): 12–39.
- Graniti A., Surico G., Mugnai L., 1999. Considerazioni sul mal dell'esca e sulle venature brune del legno della vite. *Informatore Fitopatologico* 49(5): 6–12.
- Grigoriev I.V., Cullen D., Goodwin S.B., Hibbett D., Jeffries, ... Baker S.E., 2011. Fueling the future with fungal genomics. *Mycology* 2(3): 192–209.

- Grigorie I.V., Nikitin R., Haridas S., Kuo A., Ohm R., ... Shabalov I., 2014. MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Research* 42(D1): D699–D704.
- Grosman J., 2008. Observatoire national des maladies du bois: bilan de 4 années d'observations. In: *Euroviti - Colloque viticole et œnologique*, Angers, France, 8–17.
- Grosman J., Doublet B., 2012. Maladies du bois de la vigne. Synthèse des dispositifs d'observation au vignoble, de l'observatoire 2003–2008 au réseau d'épidémiologie-surveillance actuel. *Phytoma* 651: 31–35.
- Guan X., Essakhi S., Laloue H., Nick P., Bertsch C., Chong J., 2016. Mining new resources for grape resistance against Botryosphaeriaceae: A focus on *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*. *Plant Pathology* 65(2): 273–284.
- Guérin-Dubrana L., Labenne A., Labrousse J.C., Bastien S., Rey P., Gegout-Petit A., 2013. Statistical analysis of grapevine mortality associated with esca or eutypa dieback foliar expression. *Phytopathologia Mediterranea* 52: 276–288.
- Guérin-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(1): 49–71.
- Haidar R., Roudet J., Bonnard O., Dufour M.C., Corio-Costet M.F., ... Fermaud M., 2016. Screening and modes of action of antagonistic bacteria to control the fungal pathogen *Phaeomoniella chlamydospora* involved in grapevine trunk diseases. *Microbiological Research* 192: 172–184.
- Haidar R., Yacoub A., Vallance J., Compant S., Antonielli L., ... Rey P., 2021. Bacteria associated with wood tissues of Esca-diseased grapevines: functional diversity and synergy with *Fomitiporia mediterranea* to degrade wood components. *Environmental Microbiology*. doi: 10.1111/1462-2920.15676
- Halbwachs H., Simmel J., Bassler C., 2016. Tales and mysteries of fungal fruiting: How morphological and physiological traits affect a pileate lifestyle. *Fungal Biology Review* 30(2): 36–61.
- Halleen F., Crous P.W., Petrini O., 2003. Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. *Australasian Plant Pathology* 32: 47–52.
- Hofman M.T., Arnold A.E., 2008. Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Mycological Research* 112: 331–344.
- Hofstetter V., Buyck B., Croll D., Viret O., Couloux A., Gindro K., 2012. What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? *Fungal Diversity* 54: 51–67.
- Hyde K.D., Xu J., Rapior S., Jeewon R., Lumyong S., ... Stadler M., 2019. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity* 97: 1–136.
- Jamaux-Despréaux I., Péros J.P., 2003. Genetic structure in populations of the fungus *Fomitiporia punctata* associated with esca syndrome in grapevine. *Vitis* 42(1): 43–51.
- James T.Y., Srivilai P., Kües U., Vilgalys R., 2006. Evolution of the bipolar mating system of the mushroom *Coprinellus disseminatus* from its tetrapolar ancestors involves loss of mating type-specific pheromone receptor function. *Genetics* 172: 1877–1891.
- James T.Y., Sun S., Li W.J., Heitman J., Kuo H.C., ... Olson A., 2013. Polyporales genomes reveal the genetic architecture underlying tetrapolar and bipolar mating systems. *Mycologia* 105: 1374–1390.
- John S., Wicks, T.J., Hunt J.S., Lorimer M.F., Oakey H., Scott E.S., 2005. Protection of grapevine pruning wounds from infection by *Eutypa lata*. *Australasian Plant Pathology* 34: 569–575.
- Karimi M.R., Mahmoodi B., Kazemiyani M., 2001. First report of esca of grapevine in Iran. *Phytopathologia Mediterranea* 40: S481 (Abstract).
- Kuan I.-C., Tien M., 1993. Stimulation of Mn peroxidase activity: a possible role for oxalate in lignin biodegradation. *PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(4): 1242–1246.
- Kües U., 2013. Mating type genes as master regulators of mushroom development. In: *Proceedings of the 7th International Medicinal Mushroom Conference* (Chinese Academy of Engineering, China Chamber of Commerce of Foodstuffs and Native Products, ed.), Jiangsu Alphay Biological Technology Co., Nantong City, China, 33–59.
- Kües U., 2015. From two to many: Multiple mating types in Basidiomycetes. *Fungal Biology Reviews* 29 (3-4): 126–166.
- Kuntzmann P., Villaume S., Larignon P., Bertsch C., 2010. Esca, BDA and Eutypiosis: Foliar symptoms, trunk lesions and fungi observed in diseased vinestocks in two vineyards in Alsace. *Vitis - Journal of Grapevine Research* 49(2): 71–76.
- Kraus C., Vögele R., Fischer M., 2019. The Esca complex in German vineyards: does the training system influence occurrence of GLSD symptoms? *European Journal of Plant Pathology* 155: 265–279.
- Lafon R., 1921. *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*. Imp. Roumégous et Déhan, Montpellier, France, 96 pp.

- Larignon P., Dubos B., 1997. Fungi associated with Esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 103: 147–157.
- Larignon P., Dubos B., 2000. Preliminary studies on the biology of *Phaeoacremonium*. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 184–189.
- Larignon P., Giansetto K., Salancon E., Girardon K., Berud F., ... Coarer M., 2008a. Champignons associés aux maladies du bois: une enquête en pépinières. *Rhône en VO - Revue de Viticulture et d'Oenologie de la Vallée du Rhône* 3: 26–31.
- Larignon P., Darne G., Menard E., Desache F., Dubos B., 2008b. Comment agissait l'arsénite de sodium sur l'esca de la vigne? *Progrès Agricole et Viticole* 125: 642–651.
- Laveau C., Letouze A., Louvet G., Bastien S., Guérin-Dubrana L., 2009. Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. *Phytopathologia Mediterranea*, 48(1): 32–46.
- Lecomte P., Darrieutort G., Liminana J.-M., Comont G., Muruamendiariáz A, ... Fermaud, M. 2012. New insights into esca of grapevine: the development of foliar symptoms and their association with xylem discoloration. *Plant Disease* 96: 924–934.
- Lecomte P., Diarra B., Carbonneau A., Rey P., Chevrier C., 2018. Esca of grapevine and training practices in France: results of a 10-year survey. *Phytopathologia Mediterranea* 57: 472–487.
- Letousey P., Bailleul F., Perrot G., Rabenoelina F., Boulay M., ... Fontaine F., 2010. Early events prior to visual symptoms in the apoplectic form of grapevine esca disease. *Phytopathology* 100: 424–431.
- Levasseur A., Drula E., Lombard V., Coutinho P.M., Henrissat B., 2013. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels* 6(1): 41.
- Li S., Bonneau F., Chadoeuf J., Picart D., Gégout-Petit A., Guérin-Dubrana L., 2017. Spatial and temporal pattern analyses of esca grapevine disease in vineyards in France. *Phytopathology* 107(1): 59–69.
- Liaud N., Giniés C., Navarro D., Fabre N., Crapart S., Sigoilloit J.C., 2014. Exploring fungal biodiversity: organic acid production by 66 strains of filamentous fungi. *Fungal Biology and Biotechnology* 1(1): 1.
- Lombard V., Golaconda Ramulu H., Drula E., Coutinho P.M., Henrissat B., 2014. The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research* 42: D490–D495.
- Lorrain B., Ky I., Pasquier G., Jourdes M., Dubrana L.G., Gény L., ... Teissedre P.L., 2012. Effect of Esca disease on the phenolic and sensory attributes of Cabernet Sauvignon grapes, musts and wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 18: 64–72.
- Lundell T.K., Mäkelä M.R., de Vries R.P., Hildén K.S., 2014. Chapter Eleven - Genomics, lifestyles and future prospects of wood-decay and litter-decomposing Basidiomycota. In: *Advances in Botanical Research*, (Francis M. Martin, ed.), Academic Press, 70, 329–370.
- Luque J., Martos S., Aroca A., Raposo R., Garcia-Figueroes F., 2009. Symptoms and fungi associated with declining mature grapevine plants in northeast Spain. *Journal of Plant Pathology* 91(2): 381–390.
- Magarey P. A., Carter M.V., 1986. New technology facilitates control of *Eutypa dieback* in apricots and grapevines. *Plant Protection Quarterly* 1: 156–159
- Maher N., Piot J., Bastien S., Vallance J., Rey P., Guérin-Dubrana, L., 2012. Wood necrosis in ESCA-affected vines: Types, relationships and possible links with foliar symptom expression. *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin* 46(1): 15–27.
- Marchi G., 2001. Susceptibility to esca of various grapevine (*Vitis vinifera*) cultivars grafted on different rootstocks in a vineyard in the province of Siena (Italy). *Phytopathologia Mediterranea* 40(1): 27–36.
- Marchi G., Peduto F., Mugnai L., Di Marco S., Calzarano F., Surico G., 2006. Some observations on the relationship of manifest and hidden esca to rainfall. *Phytopathologia Mediterranea* 45: 117–126.
- Markakis A.M., Kavroulakis N., Ntougias S., Koubouris G.C., Sergentani C.K., Ligoixigakis E.K., 2017. Characterization of fungi associated with wood decay of tree species and grapevine in Greece. *Plant Disease* (101): 1929–1940.
- Markakis E.A., Ligoixigakis E.K., Roussos, P.A., Sergentani C.K., Kavroulakis N., ... Koubouris, G.C., 2019. Differential susceptibility responses of Greek olive cultivars to *Fomitiporia mediterranea*. *European Journal of Plant Pathology* 153: 1055–1066.
- Martin M.T., Cobos R., 2007. Identification of fungi associated with grapevine decline in Castilla y Leon (Spain). *Phytopathologia Mediterranea* 46: 18–25.
- Masi M., Cimmino A., Revegilia P., Mugnai L., Surico G., Evidente A., 2018. Advances on fungal phytotoxins and their role in grapevine trunk diseases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66(24): 5948–5958.
- Mazzullo A., Di Marco S., Osti F., Cesari A., 2000. Bioassays on the activity of resveratrol, pterostilbene and phosphorous acid towards fungi associated with esca of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 39(3): 357–365.
- Mirabolfathy M., Hosseinian L., Peighami Ashnaei S., 2021. Fungal communities of grapevine decline

- in the main grapegrowing regions of Iran. *Indian Phytopathology* 1: 1-7.
- Mirsoleymani Z., Mostowfizadeh Ghalamfarsa R., 2019. *Fomitiporia mediterranea*, a new basidiomycete species for mycobiota of Iran. *Rostaniha* 19: 189–191.
- Mohammadi H., Banihashemi Z., Gramaje D., Armengol J., 2013. Fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Iran. *Journal of Agriculture, Science and Technology* 15:137–150.
- Mondello V., Larignon P., Armengol J., Kortekamp A., Vaczy K., ... Fontaine F., 2018a. Management of grapevine trunk diseases: knowledge transfer, current strategies and innovative strategies adopted in Europe. *Phytopathologia Mediterranea* 57 (3): 369–383.
- Mondello V., Songy A., Battiston E., Pinto C., Coppin C., ... Fontaine F., 2018b. Grapevine trunk diseases: A review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. *Plant Disease* 102(7): 1189–1217.
- Montanari E., 2010. Per una storia linguistica di Esca. In: *Il mal dell'esca della vite* (G. Surico, L. Mugnai, ed.), ARSIA Regione Toscana, Firenze, Italy, 26-34.
- Morel M., Meux E., Mathieu Y., Thuillier A., Chibani K., ... Gelhaye, E., 2013. Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi: Fungal xenomic networks. *Microbial Biotechnology* 6: 248–263.
- Moret F., Lemaître-Guillier C., Grosjean C., Clément G., Coelho C., ... Adrian M., 2019. Clone-dependent expression of esca disease revealed by leaf metabolite analysis. *Frontiers in Plant Science* 9: 1960.
- Moret F., Delorme G., Clément G., Grosjean C., Lemaître-Guillier C., ... Fontaine F., 2021. Esca-affected grapevine leaf metabolome is clone- and vintage-dependent. *Physiologia Plantarum* 171: 424–434.
- Moretti S., Pierron R., Pacetti A., Gellon M., Tarnus C., ... Farine S. 2019. Non-Enzymatic *in lignum* degradation mechanism: a way to control Grapevine Trunk Disease? *Phytopathologia Mediterranea* 58(2): 414–415 (Abstract).
- Morgenstern I., Robertson D.L., Hibbett D.S., 2010. Characterization of three mnp genes of *Fomitiporia mediterranea* and report of additional class ii peroxidases in the order Hymenochaetales. *Applied and Environmental Microbiology* 76(19): 6431–6440.
- Mostert L., Halleen F., Fourie P., Crous P.W., 2006. A review of *Phaeoacremonium* species involved in Petri disease and esca of grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 45: S12–S29.
- Mugnai L., Bertelli E., Surico G., Bruno E., 1997. Effetto di alcune sostanze fenoliche sulla crescita di funghi del legno di viti colpite dal “mal dell'esca”. *Petria* 7: 35–46.
- Mugnai L., Graniti A., Surico G., 1999. Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease* 83(5): 404–418.
- Mugnai L., Guiggiani M., Bazzo F., Marchi G., Surico G., 2010. Il mal dell'esca e la carie bianca del legno: agenti causali, sintomatologia e casi studio di esca giovane. In: *Il mal dell'esca della vite* (G. Surico, L. Mugnai, ed.), ARSIA Regione Toscana, Firenze, Italy, 65–88.
- Murolo S., Romanazzi G., 2014. Effects of grapevine cultivar, rootstock and clone on esca disease. *Australasian Plant Pathology* 43: 215–221.
- Nascimento T., Rego C., Oliveira H., 2007. Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk diseases. *Phytopathologia Mediterranea* 46: 218–224.
- Niem J.M., Billones-Baaijens R., Stodart B., Savocchia S., 2020. Diversity profiling of grapevine microbial endosphere and antagonistic potential of endophytic *Pseudomonas* against grapevine trunk diseases. *Frontiers in Microbiology* 11: 477.
- Olmo D., Gramaje D., Armengol J., 2017. Hongos asociados a las enfermedades de la madera del almendro en la Isla de Mallorca. *Revista de Fruticultura* 54: 18–29.
- Osti F., Di Marco S., 2010. Iron-dependent, non-enzymatic processes promoted by *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*, agents of esca in grapevine. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74(5–6): 309–316.
- Ouadi L., Bruez E., Bastien S., Vallance J., Lecomte P., ... Rey P., 2019. Ecophysiological impacts of Esca, a devastating grapevine trunk disease, on *Vitis vinifera* L. *PLoS ONE* 14(9): e0222586.
- Pacetti A., Pierron R., Farine S., Mugnai L., Tarnus C., ... Gellon M., 2019. Vertical vegetal endotherapy: a new mode of treatment to cure grapevine trunk diseases? *Phytopathologia Mediterranea* 58(2): 426 (Abstract).
- Pacetti A., Moretti S., Pinto C., Compant S., Farine S., ... Mugnai L., 2021. Trunk surgery as a tool to reduce foliar symptoms in diseases of the esca complex and its influence on vine wood microbiota. *Journal of Fungi* 7: 521.
- Paplomatas E.J., Elena K., Tsopelas P., Tzima A., Paraskevopoulos A., Papanikolaou A., 2006. Infection of olive trees with the fungus *Fomitiporia punctata* (*Phellinus punctatus*). *Phytopathologia Mediterranea* 45(1): 69 (Abstract).
- Pérez J., Muñoz-Dorado J., de la Rubia T., Martínez J., 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology* 5: 53–63.
- Péros J.-P., Berger G., Jamaux-Despréaux I., 2008. Symptoms, wood lesions and fungi associated with Esca in organic vineyards in Languedoc-Roussillon (France). *Journal of Phytopathology* 156: 297–303.

- Pilotti M., Gervasi F., Brunetti A., 2005. Molecular identification of *Fomitiporia mediterranea* and *Eutypa lata*/*Libertella blepharis* in *Platanus acerifolia*. *Journal of Phytopathology* 153: 193–202.
- Pilotti M., Tizzani L., Brunetti A., Gervasi F., Di Lernia G., Lumia V., 2010. Molecular identification of *Fomitiporia mediterranea* on declining and decayed hazelnut. *Journal of Plant Pathology* 92(1): 115–129.
- Polemis E., Dimou D.M., Fryssouli V., Zervakis G.I., 2019. Diversity of saproxylic basidiomycetes in *Quercus ilex* woodlands of central and insular Greece. *Plant Biosystem* 153: 385–397
- Pollastro S., Dongiovanni C., Abbatecola A., Faretra F., 2000. Observations on the fungi associated with esca and on spatial distribution of esca-symptomatic plants in Apulian (Italy) vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* 39(1): 206–210.
- Pollastro S., Dongiovanni C., Abbatecola A., De Guido, M.A., De Miccolis Angelini R. M., Faretra F., 2001. Specific SCAR primer for fungi associated with wood decay of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 40: S362–S368.
- Pouzoulet J., Pivovarov A.L., Santiago L.S., Rolshausen P.E., 2014. 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* 5: 253.
- Pouzoulet J., Scudiero E., Schiavon M., Rolshausen P.E., 2017. Xylem vessel diameter affects the compartmentalization of the vascular pathogen *Phaeoemoniella chlamydospora* in grapevine. *Frontiers in Plant Science* 8: 1442.
- Pouzoulet J., Scudiero E., Schiavon M., Santiago L.S., Rolshausen P.E., 2019. Modeling of xylem vessel occlusion in grapevine. *Tree Physiology* 39: 1438–1445.
- Quaglia M., Covarelli L., Zizzerini A., 2009. Epidemiological survey on esca disease in Umbria, central Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 84–91.
- Rábai A., Dula T., Mugnai L., 2008. Distribution of esca disease in Hungary and the pathogens causing the syndrome. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 43(1): 45–54.
- Rajaiyan M., Karimi Shahri M.R., Pirnia M., Dehvari V., Ghezeli Sefloo N., 2013. Detection and identification of some fungal agents causing grapevine decline in Northern Khorasan province vineyards using PCR technique. *Applied Entomology and Phytopathology* 81: 167–177.
- Ramsdell D. C., 1995. Winter air-blast sprayer application of benomyl for reduction of *Eutypa* dieback disease incidence in a concord grape vineyard in Michigan. *Plant Disease* 79: 399–402.
- Ravaz L., 1909. Sur l'apoplexie de la vigne. *Progrès Agricole et Viticole* 30: 547–579.
- Ravaz L., 1919. Encore l'apoplexie de la vigne. *Progrès Agricole et Viticole* 52: 601–603.
- Reisenzein H., Berger N., Nieder G., 2000. Esca in Austria. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 26–34.
- Riley R., Salamov A.A., Brown D.W., Nagy L.G., Floudas D., ... Grigoriev I.V., 2014. Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *PNAS - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (27): 9923–9928.
- Rocchetti A., Schena L., Sanzani S.M., Cacciola S.O., Mosca S., ... di San Lio G.M., 2014. Characterization of Basidiomycetes associated with wood rot of citrus in southern Italy. *Phytopathology* 104: 851–858.
- Rolshausen P.E., Greve L.C., Labavitch J.M., Mahoney N.E., Molyneux R.J., Gubler W.D., 2008. Pathogenesis of *Eutypa lata* in grapevine: identification of virulence factors and biochemical characterization of cordon dieback. *Phytopathology* 98: 222–229.
- Romanazzi G., Murolo S., Pizzichini L., Nardi S., 2009. Esca in young and mature vineyards, and molecular diagnosis of the associated fungi. *European Journal of Plant Pathology* 125(2): 277–290.
- Rubio J.J., Garzón E., 2011. Las enfermedades de madera de vid como amenaza del sector vitícola. *Revista Winetech* 2 (Noviembre): 18–21.
- Rui D., Battel C., 1963. Mise au point d'un nouveau moyen de lutte contre l'esca de la vigne. *Notiziario sulle malattie delle piante* 63: 9–18.
- Rumbos A., Rumbou I., 2001. Fungi associated with esca and young grapevine decline in Greece. *Phytopathologia Mediterranea* 40 (3): 330–335.
- Rusjan D., Persic M., Likar M., Biniari K., Mikulic-Petkovsek M., 2017. Phenolic responses to esca-associated fungi in differently decayed grapevine woods from different trunk parts of "Cabernet Sauvignon." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65(31): 6615–6624.
- Sánchez-Torres P., Hinarejos R., González V., Tuset J.J., 2008. Identification and characterization of fungi associated with esca in vineyards of the Comunidad Valenciana (Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research* 6(4): 650–660.
- Schilling M., Farine S., Péros J.P., Bertsch C., Gelhay E., 2021. Wood degradation in grapevine diseases. In: *Advances in Botanical Research*, (Mélanie Morel-Rouhier, Rodnay Sormani, eds.), Academic Press, 99, 175–207.
- Schmidt O., Gaiser O., Dujesiefken D., 2012. Molecular identification of decay fungi in the wood of urban

- trees. *European Journal of Forest Research* 131: 885–891.
- Shimada M., Ma D.-B., Akamatsu Y., Hattori T., 1994. A proposed role of oxalic acid in wood decay systems of wood-rotting basidiomycetes. *FEMS Microbiology Reviews* 13(2-3): 285–295.
- Siebert J.B., 2001. Eutypa: The economic toll on vineyards. *Wines & Vines* (April): 50–56.
- Singh Arora D., Kumar Sharma, R., 2010. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160: 1760–1788.
- Sista Kameshwar A.K., Qin W., 2020. Systematic meta-data analysis of brown rot fungi gene expression data reveals the genes involved in Fenton's reaction and wood decay process. *Mycology* 11: 22–37.
- Sofia J., Goncalves M.T., Oliveira H., 2006. Spatial distribution of esca symptomatic plants in Dão vineyards (centre Portugal) and isolation of associated fungi. *Phytopathologia Mediterranea* 45: 87–92.
- Songy A., Fernandez O., Clément C., Larignon P., Fontaine F., 2019a. Grapevine trunk diseases under thermal and water stresses. *Planta* 249(6): 1655–1679.
- Songy A., Vallet J., Gantet M., Boo A., Ronot P., ... Fontaine F., 2019b. Sodium arsenite effect on *Vitis vinifera* L. Physiology. *Journal of Plant Physiology* 238: 72–79.
- Sparapano L., Bruno G., Graniti A., 1998. Esopolisaccaridi fitotossici sono prodotti in coltura da due specie di *Phaeoacremonium* associate al complesso del 'mal dell'esca' della vite. *Petria* 8: 210–212.
- Sparapano L., Bruno G., Ciccarone C., Graniti A., 2000a. Infection of grapevines by some fungi associated with esca. I. *Fomitiporia punctata* as a wood-rot inducer. *Phytopathologia Mediterranea* 39(1): 46–52.
- Sparapano L., Bruno G., Ciccarone C., Graniti A., 2000b. Infection of grapevines by some fungi associated with esca. II. Interaction among *Phaeoacremonium chlamydosporum*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 53–58.
- Sparapano L., Bruno G., Graniti A., 2000c. Effects on plants of metabolites produced in culture by *Phaeoacremonium chlamydosporum*, *P. aleophilum* and *Fomitiporia punctata*. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 169–177.
- Sparapano L., Bruno G., Graniti A., 2001a. Three year observation of grapevines cross-inoculated with esca-associated fungi. *Phytopathologia Mediterranea* 40: S376–S386.
- Sparapano L., Bruno G., Campanella A., 2001b. Interactions between three fungi associated with esca of grapevine, and their secondary metabolites. *Phytopathologia Mediterranea* 40(3): 417–422.
- Spiteller P., 2008. Chemical defence strategies of higher fungi. *Chemistry* 14(30): 9100–9110.
- Spiteller P., 2015. Chemical ecology of fungi. *Natural Product Reports* 32: 971–993.
- Surico G., Marchi G., Ferrandino F.J., Braccini P., Mugnai L., 2000. Analysis of the spatial spread of esca in some tuscan vineyards (Italy). *Phytopathologia Mediterranea* 39: 211–224.
- Surico G., Mugnai L., Marchi G., 2006. Older and more recent observations on esca: A critical overview. *Phytopathologia Mediterranea* 45(S1): 68–86.
- Surico G., 2009. Towards a redefinition of the diseases within the esca complex of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 48: 5–10.
- Svampa G., Tosatti E.M., 1977. Prove di lotta contro il "mal dell'esca" della vite. *Informatore Fitopatologico* 12: 21–24
- Svedružić D., Jónsson S., Toyota C.G., Reinhardt L.A., Ricagno S., ... Richards N.G., 2005. The enzymes of oxalate metabolism: unexpected structures and mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433(1): 176–92.
- Tabacchi R., Fkyerat A., Poliar, C., Dubin G. M., 2000. Phytotoxins from fungi of esca of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 39(1): 156–161.
- Tanaka N., Akamatsu Y., Hattori T., Shimada M. 1994. Effect of oxalic acid on the oxidative breakdown of cellulose by the Fenton reaction. *Wood Research: Bulletin of the Wood Research Institute Kyoto University* 81: 8–10.
- Tauber J.P., Matthäus C., Lenz C., Hoffmeister D., Popp J., 2018. Analysis of basidiomycete pigments *in situ* by Raman spectroscopy. *Journal of Biophotonics* 11(6): e201700369.
- Thibault M., 2015. Le curetage. In: *Les maladies du Bois de la Vigne - Réunion du groupe national Maladies du Bois de la Vigne*, 17–18/11/2015, Université de Haute-Alsace, Colmar, France, 55–57.
- Úrbez-Torres J.R., Haag P., Bowen P., O'Gorman D.T., 2014. Grapevine trunk diseases in British Columbia: incidence and characterization of the fungal pathogens associated with esca and petri diseases of grapevine. *Plant Disease* 98: 469–482.
- Urzúa U., Kersten P.J., Vicuña R., 1998. Manganese peroxidase-dependent oxidation of glyoxylic and oxalic acids synthesized by *Ceriporiopsis subvermisporea* produces extracellular hydrogen peroxide. *Applied and Environmental Microbiology Journal* 64(1): 68–73.
- Valtaud C., Larignon P., Roblin G., Fleurat-Lessard P., 2009. Developmental and ultrastructural features of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* in relation to xylem degradation in esca

- disease of the grapevine. *Journal of Plant Pathology* 91: 37–51.
- Vasquez S.J., Gubler W.D., Leavitt G.M., 2007. Economic loss in California's table grape vineyards due to measles. *Phytopathologia Mediterranea* 46: 118 (Abstract).
- Větrovský T., Kohout P., Kopecký M., Machac A., Man M., ... Baldrian P., 2019. A meta-analysis of global fungal distribution reveals climate-driven patterns. *Nature Communication* 10: 5142.
- Viala P., 1926. Recherches sur les maladies de la vigne. Esca. *Annales des Epiphyties* 12: 5–108.
- Vicent A., García-Figueroles F., García-Jiménez J., Armengol J., Torné L., 2001. Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey. *Phytopathologia Mediterranea* 40: 325–329.
- Vinet E., 1909. L'apoplexie de la vigne en Anjou. *Revue de Viticulture* 32: 676–681.
- Wagner T., Fischer M., 2001. Natural groups and a revised system for the European poroid Hymenochaetales (Basidiomycota) supported by nLSU rDNA sequence data. *Mycological Research* 105: 773–782.
- Wagner T., Fischer M., 2002. Proceedings towards a natural classification of the worldwide taxa *Phellinus* s.l. and *Inonotus* s.l., and phylogenetic relationships of allied genera. *Mycologia* 94 (6): 998–1016.
- White T.J., Bruns T.D., Lee S., Taylor J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols* (Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., ed.), Academic Press, San Diego, USA, 315–322.
- White C.L., Halleen F., Fischer M., Mostert L., 2011. Characterisation of the fungi associated with esca diseased grapevines in South Africa. *Phytopathologia Mediterranea* 50: 204–223.
- Wicks T., Davies K., 1999. The effect of *Eutypa* on grapevine yield. *The Australian and New Zealand Grape-grower & Winemaker* 426a:15–16.
- Ye Q., Jia J., Manawasinghe I.S., Li X., Zhang W., ... Yan J., 2021. *Fomitiporia punicata* and *Phaeoacremonium minimum* associated with Esca complex of grapevine in China. *Phytopathology Research* 3: 11.
- Zanzotto A., Autiero F., Bellotto D., Dal Cortivo G., Lucchetta G., Borgo M., 2007. Occurrence of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* in grape propagation materials and young grapevines. *European Journal of Plant Pathology* 119: 183–192
- Zhuang L., Guo W., Yoshida M., Feng X., Goodell B., 2015. Investigating oxalate biosynthesis in the wood-decaying fungus *Gloeophyllum trabeum* using ¹³C metabolic flux analysis. *RSC Advances* 5(126): 104043–104047.

4. Annexe 4 : nombre de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation ou la détoxification du bois identifiés dans les génomes de *F. mediterranea* et de *T. versicolor*

SECRETOME					
			Fmed	Tver	Ref.
	OXYDOREDUCTASES	Peroxidases de classe II (POD-II)			
MnP courtes		3	13	1	
MnP longues		11	0	1	
MnP extra longues		0	0	1	
MnP atypiques		2	0	1	
LiP		0	10	1	
VP		0	2	1	
VP atypique		0	1	1	
GP		1	0	1	
Total POD-II		17	26		
GMC					
CDH		1	1	1	
AAO		2	3	1	
MOX		2	4	1	
POX		0	2	1	
PDH		0	0	1	
GOX		0	0	1	
Total GMC		5	10	1	
CRO					
GLX		0	5	1	
CRO1		1	1	1	
CRO2		1	1	1	
CRO3		0	0	1	
CRO4/5		1	1	1	
CRO6		1	1	1	
Total CRO		4	9	1	
MCO					
Laccases (sens strict)		10	7	1	
Ferroxidases	1	2	1		
Ferroxidases/laccases	-	1	1		
Ascorbate oxydases	-	0	1		
MS	-	0	1		
Total MCO	11	10	1		
Autres oxydoréductases					
LPMO	13	18	1		
Total oxydoréductases	50	73			

SECRETOME					
			Fmed	Tver	Ref.
	CAZY	GH			
GH3		7	11	1	
GH5		6	5	1	
GH6		2	1	1	
GH7		2	4	1	
GH10		4	6	1	
GH12		3	5	1	
GH28		16	11	1	
GH74		4	1	1	
GH43		6	3	1	
Total GH		50	47		
CE					
CE1		0	3	1	
CE16		6	7	1	
CE5		0	0	1	
CE8		3	2	1	
CE12		2	0	1	
CE15		1	2	1	
Total CE		12	14		
Total CAZY		62	61		

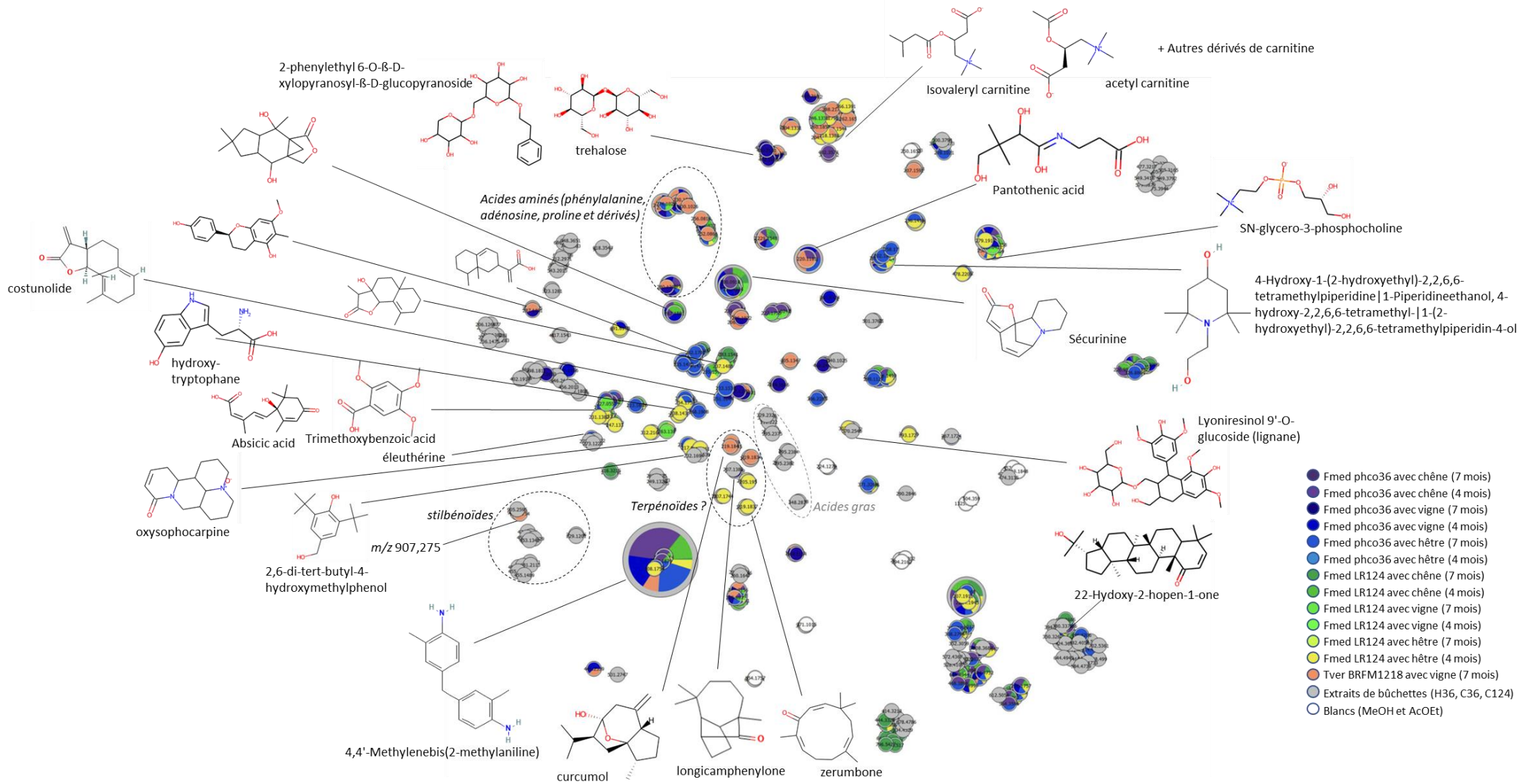
XENOME						
			Fmed	Tver	Ref.	
	cytP450	cytP450				
CYP51 (class II)		1	3	2		
CYP52 (class II)		9	14	2		
CYP53 (class II)		12	11	2		
CYP54		13	8	2		
CYP61 (class II)		2	1	2		
CYP64 (class II)		40	72	2		
CYP67		9	6	2		
CYP505 (class VIII)		1	2	2		
CYP534		21	54	2		
CYP547		3	5	2		
ND		4	2	2		
Total cytP450		130	190	1,2		
GST		GST				
		GSTFuA	16	6	2	
	Ure2pA	0	8	2		
	Ure2pB	2	2	2		
	GTT1	1	1	2		
	GTT2	3	2	2		
	GSTF	7	0	2		
	GSTO	6	16	2		
	GHR	3	3	2		
Total GST	38	38	2			

Annexes

Abréviations :

MnP : peroxydase à manganèse ; *LiP* : peroxydases à lignine ; *VP* : peroxydases versatiles ; *GP* : peroxydase générique ; *GMC* : oxydoréductases à glucose-choline-méthanol ; *CDH* : cellobiodéhydrogénases ; *AAO* : oxydases à aryl(aldéhyde)-alcool ; *MOX* : oxydases à méthanol ; *POX* : oxydases à 2-pyranose ; *PDH* : déhydrogénases à pyranose ; *GOX* : oxydases à glucose ; *CRO* : oxydases à radical cuivre ; *GLX* : oxydases à glyoxal ; *MCO* : oxydases à multiple cuivre ; *MS* : enzymes impliquées dans la synthèse de mélanine ; *LPMO* : mono-oxygénases lytiques à polysaccharides ; *GH* : hydrolases à glycosides ; *CE* : estérases à carbohydrate ; *CAZY* : enzymes spécifiques aux carbohydrates ; *cytP450 (CYP)* : cytochromes P450 ; *ND* : non déterminé ; *GST* : transférase de glutathion ; *Ref* : Référence (¹Floudas et al., 2012; ²Morel et al., 2013)

5. Annexe 5 : réseau moléculaire obtenu à partir des exsudats des cultures de *F. mediterranea* et *T. versicolor* en présence de bûchettes





Résumé

L'Esca est une des plus dévastatrices des maladies du bois de vigne, qui affectent les vignobles du monde entier. L'un de ses principaux symptômes est la formation de pourriture blanche dans le bois, également appelée *amadou*. Au sein de cette pourriture blanche, *Fomitiporia mediterranea* (M. Fischer) est l'espèce majoritairement identifiée en Europe. Les champignons de pourriture blanche ont co-évolué avec leurs substrats et ont pu développer des mécanismes de dégradation et de détoxification spécifiquement adaptés. L'objectif principal de cette thèse est de mieux comprendre en quoi *F. mediterranea* est adapté à son substrat, le bois de vigne. Son comportement au cours de la dégradation de bois de différentes espèces a été étudié. Le taux de minéralisation, la perte de masse, la composition chimique du bois en composés structuraux et extractibles, la production de biomasse fongique et la sécrétion de protéines (sécrétome) au cours de cultures sur sciure ont été suivis. Dans un second temps, la colonisation par *F. mediterranea* de bûchettes de bois a été étudiée. En complément des approches physiologiques, une approche de métabolomique non-ciblée, à l'aide de réseaux moléculaires, a été utilisée pour décrire les métabolomes des bois et du champignon au cours de la colonisation.

F. mediterranea est capable de dégrader des espèces de bois différentes, dont le bois de vigne cv. 'Gewurztraminer' et 'Riesling', de hêtre et de chêne, en sciure et en bûchettes, en adoptant pour toutes un schéma de dégradation de type simultané. En parallèle, une régulation de son secrétome est observée en fonction de son substrat : un plus grand nombre d'oxydoréductases sont sécrétées sur la sciure de vigne. Cette régulation pourrait être liée à la dégradation observée de la lignine et des métabolites spécialisés du bois de vigne, principalement des stilbènes. Plusieurs facteurs, autres que la composition chimique et structurale du substrat, pourraient être impliqués dans l'adaptation de *F. mediterranea* à son substrat et sont également discutés.

Ce travail contribue à enrichir les connaissances sur la physiologie de *F. mediterranea*, une des espèces clés dans le complexe fongique associé à l'Esca.

Mots-clés : Esca, *Fomitiporia mediterranea*, pourriture blanche, adaptation, dégradation du bois

Abstract

Esca is one of the most devastating of the grapevine trunk diseases, that affect vineyards around the world. One of its main symptoms is white rot, also called *amadou*. In white rot, *Fomitiporia mediterranea* (M. Fischer) is the major species identified in Europe. White-rot fungi have evolved with their substrates and may have developed specifically adapted degradation and detoxification mechanisms.

The main objective of this thesis is to understand how *F. mediterranea* is adapted to its substrate, grapevine wood. The behavior of *F. mediterranea* during wood degradation on different wood species was monitored. Carbon mineralization rate, wood mass loss, chemical composition in structural compounds and extractives, fungal biomass production and protein secretion (secretome) upon cultures on sawdust were measured. In a second step, the colonization of *F. mediterranea* on wood blocks was followed. In addition to the physiological approach, a non-targeted metabolomic approach, with molecular networking, was used to describe fungal and wood metabolomes during colonization.

F. mediterranea is able to degrade several wood species, including grapevine cv. 'Gewurztraminer' and 'Riesling', beech and oak, in sawdust or blocks, using a simultaneous degradation pattern. Parallely, the fungus regulates its secretome in relation with its substrate: a larger number of oxidoreductases were secreted on grapevine sawdust. This could be correlated with the observed degradation of grapevine lignin and specialized metabolites, mainly stilbenes. Other factors than the structural and chemical composition of the substrate, which could be involved in the adaptation of *F. mediterranea*, are discussed.

This work contributes to a better knowledge of the physiology of *F. mediterranea*, one of the key fungal species in Esca complexe disease.

Keywords: Esca, *Fomitiporia mediterranea*, white-rot, adaptation, wood degradation