



UNIVERSITÉ DE
TUNIS EL MANAR

université
de BORDEAUX

Thèse de doctorat de l'université El Manar (Tunisie) et de l'université de Bordeaux

Awatef Rezgui

Soutenue le 20 décembre 2016

Cotutelle doctorat de l'Université de Bordeaux et Université El Manar de Tunis
Co-encadrement : P. Rey (UMR SAVE) et Najla Sadfi Zouaoui (LMBA, Tunis)

Titre de la thèse

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

Résumé

Les maladies du bois de la vigne (MDBs) et plus particulièrement l'esca, sont devenues en l'espace de deux décennies l'objet de préoccupations majeures puisqu'elles mettent en danger la pérennité de nombreux vignobles partout dans le monde. En Tunisie, ces maladies sont peu connues mais elles semblent être en pleine expansion et, en France, environ 13% du vignoble est improductif à cause des dépérissements qu'elles provoquent. Pour lutter contre les MDBs, les filières viticoles françaises et tunisiennes sont actuellement dans une impasse technique car elles ne disposent d'aucune méthode de lutte chimique « curative ».

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est de :

- de déterminer quels agents pathogènes sont responsables des dégradations du bois de la vigne en Tunisie ? Les symptômes correspondent-ils à ceux de l'esca ? Existe-t-il une spécificité des agents pathogènes chez les ceps tunisiens ?
- aussi afin de lutter contre ces maladies du bois (MDBs), de potentiels agents de biocontrôle bactériens ont été recherchés dans les parties ligneuses de ceps sélectionnés dans des vignobles tunisiens et un vignoble français. Ils ont été caractérisés et des essais de protection in planta ont été réalisés.

Dans un premier temps, une prospection de 10 vignobles dans la région nord de la Tunisie a été effectuée pour déterminer l'existence des MDBs. Selon les sites de prélèvements, le pourcentage de ceps exprimant des symptômes semblables à ceux de l'esca variait de 0,3 à 6%. Trois champignons connus pour leur implication dans

les MDBs, i.e. *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Neofusicoccum parvum* et *Schizophyllum commune*, ont été isolés du bois nécrosé de ceps de vignes présentant des symptômes foliaires d'esca prélevés dans la région de Mornag. Ces champignons ont été identifiés au niveau morphologique et moléculaire. Leur pathogénicité a été confirmée après inoculation sur jeunes plants de vigne.

Des travaux originaux basés sur la co-inoculation de plants de vigne par ces 3 pathogènes ont montré qu'ils pouvaient rentrer en compétition entre eux au sein du végétal. Par ailleurs, sur le même thème, 2 autres pathogènes des MDBs, i.e. *Phomopsis viticola* et *Diplodia seriata*, ont été isolés dans une autre étude à partir de ceps prélevés dans la même région en Tunisie.

Dans une deuxième étape, la microflore bactérienne colonisant les tissus ligneux de vignes prélevées dans le nord de la Tunisie a été étudiée afin de rechercher des agents de lutte biologique potentiels. La technique d'empreinte moléculaire Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) a d'abord montré que les communautés bactériennes étaient différentes en fonction des tissus qu'elles colonisaient, i.e. le bois nécrosé ou sain. Soixante-neuf souches bactériennes ont été isolées par méthode pasteurienne, et les 19 souches les plus abondantes ont fait la suite de l'étude.

L'identification moléculaire de ces souches par séquençage de l'ARNr 16S et du gène *rpoB* a montré l'existence de 4 genres colonisant les ceps de vignes : *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Pantoea* et *Pseudomonas*. Ces bactéries ont été également caractérisées au niveau biochimique, métabolique et génétique. Des tests de sélection *in vitro* contre les trois pathogènes fongiques ont été effectués, suite auxquels, une souche B6 de *B. subtilis* a été sélectionnée pour des essais de protection *in planta* en serre.

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

Une dernière étude, plus exploratoire, a consisté à étudier par séquençage haut-débit (pyroséquençage 454) les bactéries qui colonisent plusieurs organes de la vigne : les baies, le bois, les racines, l'écorce et les feuilles. Le but ici est de rechercher des bactéries qui seraient spécifiquement associées aux tissus sains du végétal, ceci afin d'aller rechercher de nouveaux agents de biocontrôle potentiels naturellement présents sur ces plantes.

