

République Algérienne Démocratique et Populaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrach

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة بالحراش

Thèse

Présentée par

BERRAF-TEBBAL AKILA

**en vue de l'obtention du Diplôme de Docteur
en Sciences Agronomiques**

Spécialité : Phytopathologie

**Dynamique spatio-temporelle de l'eutypiose et l'esca de la
vigne dans le sahel algérois. Taxonomie et phylogénie des
agents pathogènes associés**

Soutenue publiquement le 17/01/2013

Devant le jury :

Président	M. Guezlane A.	Maître de conférences à l'E.N.S.A. d'El Harrach
Promoteur	M. Bouznad Z.	Professeur à l'E.N.S.A. d'El Harrach
Co-promoteur	M. Phillips A. J. L.	Professeur à l'Université Nova de Lisboa, Portugal
Examineurs	Mme Krimi Z.	Professeur à l'Université de Blida
	Mme Louanchi M.	Maître de conférences à l'E.N.S.A. d'El Harrach
	M. Sabaou N.	Professeur à L'E.N.S. de Kouba
Invité	M. Péros J.P.	Chargé de recherches à l'INRA de Montpellier

Année universitaire : 2012-2013

Dédicaces

A mes très chers parents,

Vos encouragements et vos prières m'ont toujours soutenue et guidé. En ce jour, j'espère réaliser un de vos rêves et être digne de vous. Veuillez trouver, mes très chers parents, dans cette thèse le fruit de votre dévouement ainsi que l'expression de ma gratitude et de mon profond amour. Que Dieu vous garde et vous procure santé et longue vie.

Ma profonde reconnaissance à mon époux pour son soutien sans faille, sa grande indulgence, sa compréhension et surtout sa contribution dans le partage du stress de la recherche et sans qui, une grande part de ce travail n'aurait pas été accomplie. Je suis heureuse de partager cette thèse avec lui.

Je dédie aussi ce travail à mes très chers enfants Yara, Maissa et Racim. Je les remercie de leur patience et leur compréhension.

A mes frères et sœurs pour leur soutien permanent et leurs encouragements continus. Ils ont vécu en même temps que moi toutes les étapes de cette thèse, avec ses joies et ses peines.

A ma belle famille plus particulièrement mes beaux-parents.

A toute ma famille et mes amis.

REMERCIEMENTS

Cette thèse est une œuvre collective et sa réalisation n'aurait pas été possible sans la générosité, l'hospitalité et le support de plusieurs personnes en Algérie, au Portugal et en France. J'ai eu la chance d'avoir, non pas un, mais trois directeurs de thèse, qui se sont tous impliqués et m'ont apporté des points de vue différents, des aides et connaissances complémentaires.

Je tiens tout d'abord à exprimer mes sincères remerciements à mon directeur de thèse, monsieur Zouaoui Bouznad, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d' El Harrach à Alger, sans qui ce travail n'aurait pas vu le jour. Je lui suis reconnaissante pour le temps qu'il m'a généreusement accordé, pour son soutien scientifique, ses nombreux conseils et encouragements tout au long de cette recherche. Il a su me supporter et me conseiller aux moments opportuns. Je lui adresse toute ma gratitude et mon plus profond respect.

Mes vifs remerciements vont également à mon co-directeur de thèse, monsieur le professeur Alan Jean Lander Phillips de l'Université Nova de Lisboa Portugal, qui a grandement contribué à la réalisation de cette thèse. Sa présence, son écoute et ses conseils avisés m'ont énormément aidé à m'affirmer et à évoluer en tant que chercheur. Je lui adresse ici toute ma reconnaissance et mon admiration.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde gratitude au Dr Jean-Pierre Péros, chargé de recherches à l'INRA de Montpellier, pour m'avoir encadré au cours du Magister et de m'avoir accueilli encore une fois dans son laboratoire. Pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail et pour l'accueil bienveillant qu'il m'a toujours réservé, tant à l'institut qu'au sein de sa famille. Merci d'avoir été le point de départ de cette grande aventure.

Mes remerciements et mon profond respect vont à monsieur A. Ghezlane, maître de conférences à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrach à Alger, d'avoir accepté la charge de présider le jury de cette thèse.

Je tiens également à exprimer mes vifs remerciements et ma gratitude aux membres du jury pour la confiance qu'ils m'ont témoigné et l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail :

Madame Z. Krimi, Professeur à l'Université Saad Dahled de Blida, qui a suivi avec intérêt la progression de ce travail et m'a toujours prodigué son soutien scientifique et ses encouragements.

Madame M. Louanchi, maître de conférences à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrach à Alger.

Monsieur N. Sabaou, Professeur à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba (Alger).

Qu'il me soit permis de remercier plus particulièrement Dr Gorge Santos et Dr Marco Cohelo Dias de l'Université Nova de Lisboa Portugal, pour le temps qu'ils m'ont accordé dans l'apprentissage des techniques de biologie moléculaire et l'utilisation des différents logiciels de phylogénie. Je tiens vivement à leur exprimer ma profonde reconnaissance et ma gratitude pour leur disponibilité, leur patience et leurs qualités humaines.

Ce fut un privilège de travailler dans un cadre aussi chaleureux et propice au travail en équipe que l'a été le laboratoire de microbiologie de l'Université Nova de Lisboa au Portugal. Je remercie chaleureusement Marcia Palma, Elisabete Valerio, Marco Cohelo, Gorge Santos, Alessendro Spagnolo (Italie), Jafar Abdollahzadeh (Iran), Joana Lopez et Nicole pour leur bonne humeur, leurs encouragements quotidiens, leurs patience et écoute. Merci de m'avoir rendu les séjours agréables et aussi enrichissants sur le plan personnel que professionnel.

Je tiens à remercier vivement tous les membres du laboratoire de contrôle de qualité de l'institut Pasteur d'Alger. Bien évidemment Dr Touabti, ex-chef de service, pour l'accueil toujours bien veillant qu'elle m'a réservé. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude. Mesdames, L. Daid, A. Boukechabia, Ahlem, Khadidja, Lamia, Nacera et Maya sans oublier Messieurs Kezal et Daoued ont toujours été prêts à m'aider et avec qui j'ai partagé de très bons moments.

Un grand merci aux collègues et amis enseignants de la faculté Agro-Vétérinaire et Biologie de Blida pour leur soutien pendant les années d'études et pour tous les excellents souvenirs.

Je ne peux achever cet avant propos sans remercier vivement tous les viticulteurs de la région de Tipaza pour leur collaboration dans le travail de terrain et pour nous avoir permis de réaliser les prélèvements dans leurs parcelles.

Bref, je remercie toutes les personnes que j'ai côtoyées durant ces années, et avec qui mes rapports furent aussi divers qu'enrichissants.

TABLES DES MATIERES

Dédicace.....	i
Remerciements.....	ii
Résumé.....	iv
Abstract.....	xiii
ملخص.....	iv
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux.....	x
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	
1. Les maladies fongiques vasculaires ou maladies du bois.....	5
2. L'eutypiose.....	5
2.1. Taxonomie et phylogénie de l'agent pathogène.....	5
2.2. Répartition et incidence économique de l'eutypiose.....	8
2.3. Symptomatologie.....	9
2.3.1. Au niveau des rameaux herbacés.....	9
2.3.2. Au niveau du bois.....	11
2.4. Biologie de l'agent causal.....	11
2.4.1. Forme asexuée : <i>Libertella blepharis</i> A.L.Smith.....	12
2.4.2. Forme sexuée : <i>Eutypa lata</i> (Pers.)Tul& C.Tul.....	12
2.4.3. Cycle infectieux.....	12
2.4.4. Diversité génétique d' <i>Eutypa lata</i>	13
3. Le syndrome de l'esca.....	14
3.1. Les champignons impliqués dans le syndrome de l'esca.....	15
3.2. Taxonomie et phylogénie des agents pathogènes impliqués dans l'esca.....	15
3.2.1. <i>Phaeoconiella chlamydospora</i>	15
3.2.2. <i>Phaeoacremonium</i> spp.....	18
3.2.3. <i>Eutypa lata</i>	19
3.2.4. <i>Fomitiporia mediterranea</i>	19
3.2.5. Les <i>Botryosphaeriaceae</i>	23
3.3. Répartition et incidence économique de l'esca.....	25
3.4. Symptomatologie.....	25
3.4.1. Forme lente.....	26
3.4.2. Forme foudroyante ou apoplexie.....	28
3.5. Facteurs influençant le développement de l'esca et l'eutypiose.....	28
3.5.1. Conditions climatiques.....	28
3.5.2. Cépages.....	28
3.5.3. Age de la vigne.....	29
3.5.4. Mode de conduite.....	29
3.5.5. Vigueur.....	29
3.6. Méthodes de lutte.....	29
CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES	
1. SYNOPTIQUE DU SITE D'ETUDE.....	31
1.1. Localisation géographique et caractéristiques climatiques.....	31

1.2. Caractéristiques des parcelles étudiées.....	33
2. EPIDEMIOLOGIE ET REPARTITION SPATIO-TEMPORELLE DE L'EUTYPIOSE ET DE L'ESCA.....	33
2.1. Méthodologie des enquêtes.....	34
2.1.1. Choix des parcelles et échantillonnage.....	34
2.1.2. Echelle d'évaluation de l'eutypiose.....	35
2.1.3. Echelle d'évaluation de l'esca.....	35
2.1.4. Observations et notations des symptômes.....	35
2.2. Estimation de l'eutypiose, des bras-morts, de l'esca et de la mortalité.....	36
2.3. Incidence de l'eutypiose.....	37
2.4. Incidence de l'esca.....	37
2.5. Dynamique spatio-temporelle de l'eutypiose, de l'esca et de la mortalité.....	37
2.5.1. Analyses statistiques.....	38
3. IDENTIFICATION DES AGENTS PATHOGENES IMPLIQUÉS DANS L'ESCA ET L'EUTYPIOSE DE LA VIGNE.....	39
3.1. Prélèvement des ceps à analyser.....	39
3.1.1. Désinfection des bûchettes et isolement.....	39
3.1.2. Purification et conservation des isolats.....	40
3.2. Méthodes d'identification des isolats.....	40
3.2.1. Matériel fongique.....	42
3.3. Identification moléculaire des isolats.....	43
3.3.1. Matériel génomique.....	43
3.3.1.1. Extraction de l'ADN.....	43
3.3.1.2. Evaluation quantitative et qualitative de l'ADN.....	44
3.3.1.3. Amorces utilisées.....	44
3.3.2. Génotypage par la technique MSP-PCR (Microsatellite-Primed PCR)....	45
3.3.2.1. Protocole d'amplification par MSP-PCR.....	45
3.3.3. Séquençage.....	46
3.3.3.1. Amplification de la région ITS (Internal Transcribed Spacer).....	47
3.3.3.2. Amplification du facteur d'élongation de traduction du gène 1-alpha (EF1- α).....	48
3.3.3.3. Amplification du gène de la β -tubuline.....	48
3.3.3.4. Amplification du gène d'actine.....	49
3.3.3.5. Purification de l'ADN et séquençage.....	49
3.3.4. Analyses phylogénétiques.....	50
3.3.4.1. Traitement des séquences.....	50
3.3.4.2. Alignement des séquences.....	50
3.3.5. Construction des arbres phylogénétiques.....	60
3.3.5.1. Analyses simultanées des séquences.....	60
3.3.5.2. Visualisation des arbres phylogénétiques.....	62
3.4. Caractérisation morphologique et culturale des isolats.....	62
3.4.1. Caractères culturels et aspect morphologique des colonies.....	63
3.4.2. Etude morpho-taxonomique en microscopie photonique.....	63
3.4.3. Induction de la sporulation sur aiguilles de pin.....	63
3.4.4. Mesure de la vitesse de croissance mycélienne et optimum thermique.....	64

CHAPITRE III. RESULTATS

I. EPIDEMIOLOGIE ET DYNAMIQUE SPATIO-TEMPORELLE DE L'EUTYPIOSE, L'ESCA ET LA MORTALITE.....

1. Symptômes foliaires de l'eutypiose et de l'esca observés sur le terrain.....	65
2. Estimation des dépérissements au niveau des vignobles : Bilan des enquêtes 2006, 2007, 2008.....	70
2.1. Taux d'expression des symptômes de l'eutypiose, de l'esca, des bras morts et de la mortalité pour l'année 2006.....	70
2.2. Taux d'expression des différents symptômes pour l'année 2007.....	71
2.3. Taux d'expression des différents symptômes pour l'année 2008.....	71
3. Incidences de l'eutypiose aux vignobles.....	73
4. Incidences de l'esca aux vignobles.....	73
5. Répartition spatio-temporelle de l'esca, l'eutypiose et de la mortalité.....	74
5.1. Parcelles observées uniquement en 2006.....	74
5.2. Matrices de transition pour les parcelles observées deux et trois années.....	75
5.2.1. Résultats cumulés sur deux années (2006/2007).....	75
5.2.2. Résultats cumulés sur trois années (2006/2007/2008).....	76

II. IDENTIFICATION DES AGENTS FONGIQUES IMPLIQUES DANS LE

DEPERISSEMENT DE LA VIGNE	85
1. Description des symptômes internes du bois des ceps.....	87
1.1. Localisation des nécroses au niveau du cep en relation avec les symptômes des parties herbacées.....	87
1.2. Types de nécroses du bois en relation avec les symptômes des parties herbacées.....	87
2. Agents pathogènes impliqués dans l'esca et l'eutypiose.....	88
2.1. Fréquences d'isolement des agents fongiques.....	88
2.2. Localisation des différents agents fongiques au niveau des ceps.....	95
3. Identification des <i>Phaeoacremonium</i> spp.....	97
3.1. Caractérisation moléculaire des isolats de <i>Phaeoacremonium</i> spp.....	97
3.1.1. Génotypage des régions microsattellites par MSP-PCR.....	97
3.1.2. Séquençage et analyses phylogénétiques.....	100
3.1.2.1. Amplification du gène de la β -tubuline.....	100
3.1.2.2. Amplification du gène de l'actine.....	100
3.1.2.3. Analyses phylogénétiques.....	101
3.1.2.4. Soumission des séquences à GenBank.....	101
3.2. Fréquences d'isolement des espèces de <i>Phaeoacremonium</i> spp. et leur localisation au niveau des ceps.....	104
3.3. Caractérisation morphologique des <i>Phaeoacremonium</i> spp.....	105
3.3.1. <i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	105
3.3.2. <i>Phaeoacremonium parasiticum</i>	105
3.3.3. <i>Phaeoacremonium venezuelense</i>	108

3.3.4. <i>Phaeoacremonium hispanicum</i>	108
4. Identification des espèces de la famille des <i>Botryosphaeriaceae</i>	112
4.1. Caractérisation moléculaire des <i>Botryosphaeriaceae</i>	112
4.1.1. Génotypage des régions microsatellites par MSP-PCR.....	112
4.1.2. Séquençage et analyses phylogénétiques.....	112
4.1.2.1. Amplification des ITS.....	112
4.1.2.2. Amplification du gène du facteur d'élongation.....	112
4.1.2.3. Analyses phylogénétiques.....	115
4.2. Fréquences d'isolement des espèces des <i>Botryosphaeriaceae</i> et leur localisation au niveau des ceps.....	119
4.3. Caractérisation morphologique des espèces des <i>Botryosphaeriaceae</i>	120
4.3.1. <i>Diplodia seriata</i>	120
4.3.2. <i>Lasiodiplodia</i> sp.....	120
4.3.3. <i>Neofusicocum parvum</i> , <i>Neofusicocum australe</i> et <i>Neofusicocum mediterraneum</i>	123
4.3.4. <i>Botruosphaeria dothidea</i>	127
5. Identification des <i>Phaeomoniella</i> spp	127
5.1. Caractérisation moléculaire des <i>Phaeomoniella</i> spp.....	127
5.1.1. Génotypage des régions microsatellites par MSP-PCR.....	127
5.1.2. Séquençage et analyses phylogénétiques.....	128
5.1.2.1. Amplification des ITS.....	128
5.1.2.2. Analyses phylogénétiques.....	128
5.2. Caractérisation morphologique de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	130
6. Identification d'<i>Eutypa</i>spp	132
6.1. Caractérisation moléculaire d' <i>Eutypa</i> spp.....	132
6.1.1. Génotypage des régions microsatellites par MSP-PCR.....	132
6.1.2. Séquençage et analyses phylogénétiques.....	132
6.1.2.1. Amplification des ITS.....	132
6.1.2.2. Analyses phylogénétiques.....	134
6.2. Caractérisation morphologique d' <i>Eutypa lata</i>	134
7. Identification des <i>Fomitiporia</i> spp	137
7.1. Caractérisation moléculaire des <i>Fomitiporia</i> spp.....	137
7.1.1. Génotypage des régions microsatellites par MSP-PCR.....	137
7.1.2. Séquençage et analyses phylogénétiques.....	137
7.1.2.1. Amplification des ITS.....	137
7.1.2.2. Analyses phylogénétiques.....	139
7.2. Caractérisation morphologique de <i>Fomitiporia mediterranea</i> , <i>Phellinus mori</i> et <i>Fomitiporella</i> spp.....	139
CHAPITRE IV. DISCUSSION	
I. EPIDEMIOLOGIE ET DYNAMIQUE SPATIO-TEMPORELLE DE L'EUTYPIOSE, L'ESCA ET LA MORTALITE.....	141
II. IDENTIFICATION DES AGENTS FONGIQUES IMPLIQUES DANS LE DEPERISSEMENT DE LA VIGNE.....	145
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	154
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	157
ANNEXE	179

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Un des 36 Arbres phylogénétiques des Diatrypaceae obtenus par maximum de parcimonie à partir des séquences ITS.....	7
Figure 2	Symptômes d'eutypiose.....	10
Figure 3	Un des 2 Arbres phylogénétiques de <i>Phaeomoniella</i> spp. obtenus par maximum de parcimonie à partir des séquences ITS.....	17
Figure 4	Un des 42 Arbres phylogénétiques des <i>Phaeoacremonium</i> spp. obtenus par maximum de parcimonie à partir de l'alignement combiné des séquences de gènes de TUB et ACT.....	20
Figure 5	Arbre consensus des <i>Fomitiporia</i> spp. obtenu par la méthode bayésienne à partir de l'alignement combiné des séquences d'ITS, LSU et TEF.....	22
Figure 6	Un des 416 arbres phylogénétiques des Botryosphaeriaceae obtenus par maximum de parcimonie à partir de l'alignement combiné des séquences d'ITS et TEF.....	24
Figure 7	Symptômes d'esca.....	27
Figure 8	Limite géographique de la Mitidja (Mutin, 1977).....	31
Figure 9	Diagrammes ombrothermiques de Gaussen. Année : 2006 - 2007 - 2008.....	32
Figure 10	Représentation schématique d'une parcelle d'observation.....	34
Figure 11	Schéma des étapes de la caractérisation morphologique et moléculaire des isolats.....	41
Figure 12	Préparation des aiguilles de pin pour l'autoclavage; b: Aiguilles de pin avec des Pycnides.....	64
Figure 13	Symptômes d'eutypiose sur les parties herbacées. Symptôme d'eutypiose sur un seul bras.....	66
Figure 14	Cep avec un bras mort. Nombre important de ceps dépéris.....	67
Figure 15	Symptômes d'esca sur feuille de cépage noir. Symptômes d'esca sur fruits. Forme lente de l'esca.....	68
Figure 16	Forme apoplectique de l'esca. Dessèchement brutal d'un cep chargé de fruits.....	69
Figure 17	Pourcentage de ceps morts, présentant des symptômes d'eutypiose, d'esca et des bras morts (%) pour l'année 2006.....	71
Figure 18	Pourcentage de ceps morts, présentant des symptômes d'eutypiose, d'esca et des bras morts (%) pour l'année 2007.....	72
Figure 19	Pourcentage de ceps morts, présentant des symptômes d'eutypiose, d'esca et des bras morts (%) pour l'année 2008.....	72
Figure 20	Incidences de l'eutypiose dans les différentes parcelles (%).....	73
Figure 21	Incidences de l'esca dans les différentes parcelles (%).....	74
Figure 22	Cartographie 2006 des parcelles A et B.....	78
Figure 23	Cartographies du cumul 2006 et 2007 des parcelles E, G et H.....	79
Figure 24	Cartographies du cumul 2006, 2007 et 2008 des parcelles C, D et F.....	80
Figure 25	Cartographies du cumul 2006, 2007 et 2008 des parcelles I et J.....	81
Figure 26	Analyse statistique de la dépendance spatiale entre ceps pour la mortalité et l'expression des symptômes d'eutypiose et d'esca dans deux parcelles observées uniquement en 2006.....	82
Figure 27	Analyse statistique de la dépendance spatiale entre ceps pour la mortalité et l'expression des symptômes d'eutypiose et d'esca dans trois parcelles observées en 2006 et en 2007.....	83

Figure 28	Analyse statistique de la dépendance spatiale entre ceps pour la mortalité et l'expression des symptômes d'eutypiose et d'esca dans trois parcelles observées en 2006/ 2007/2008.....	
Figure 29	Nécrose brune et dure en position centrale. Nécrose brune et dure en position sectorielle caractéristique de l'eutypiose. Nécrose claire et tendre délimité par un liseré en position sectorielle. Coupes transversales dans un tronc montrant la succession des nécroses. Ponctuations noires au niveau du bois sain.....	84
Figure 30	Profils MSP-PCR des isolats de <i>Phaeoacremonium</i> spp. générés par l'amorce M13 après séparations par électrophorèses dans des gels d'agarose à 1,5%, à 80V pendant 3H30mn.....	86
Figure 31	Dendrogramme des profils MSP-PCR des <i>Phaeoacremonium</i> spp. obtenus avec l'amorce (GTG) ₅	98
Figure 32	Produits d'amplification du gène des β -tubulines des 17 isolats <i>Phaeoacremonium</i> spp. par les amorces T1 et Bt2b.....	99
Figure 33	Produits d'amplification du gène d'actine des 17 isolats <i>Phaeoacremonium</i> spp. par les amorces ACT 512F et ACT 783R.....	100
Figure 34	Un des 4 arbres phylogénétiques de <i>Pm</i> obtenu par un maximum de parcimonie à partir des séquences ITS (TL=1518 pas, CI=0,511, RI=0,857, HI=0,489). Les nombres sur les lignes sont les valeurs bootstrap supérieures à 70% avec un rééchantillonnage de 1000 fois. Les espèces de la présente étude sont représentées en gras. <i>Pleurostomophora richardsiae</i> et <i>Wuestneia molokaiensis</i> ont été utilisées comme outgroup.....	100
Figure 35	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	102
Figure 36	<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>	106
Figure 37	<i>Phaeoacremonium venezuelense</i>	107
Figure 38	<i>Phaeoacremonium hispanicum</i>	110
Figure 40	Dendrogramme des profils MSP-PCR des <i>Botryosphaeriaceae</i> obtenus avec l'amorce (GTG) ₅	111
Figure 41	Produits d'amplification de la région ITS des 24 isolats des <i>Botryosphaeriaceae</i> par les amorces ITS1 et ITS4; M: marqueur de poids moléculaire (1kb).....	113
Figure 42	Produits d'amplification du gène EF-1 α des 24 isolats des <i>Botryosphaeriaceae</i> par les amorces EF1-728F et EF1-986R; M: marqueur de poids moléculaire (1kb).....	114
Figure 43	Un des 94 arbres phylogénétiques obtenus par maximum de parcimonie à partir de l'alignement combiné des séquences d'ITS et TEF (585 pas, CI = 0,831, RI = 0,959, HI = 0,169). Les nombres sur les lignes sont les valeurs Bootstrap supérieures à 70% avec un rééchantillonnage de 1000 fois. <i>Botryosphaeria stevensi</i> et <i>Botryosphaeria obtusa</i> ont été utilisées comme outgroup.....	116
Figure 44	Un des 140arbres phylogénétiques obtenus par maximum de parcimonie à partir de l'alignement combiné des séquences d'ITS et TEF ACT (CI = 0,624, RI = 0,898, HI = 0,376). Les nombres sur les lignes sont les valeurs Bootstrap supérieures à 70% avec un rééchantillonnage de 1000 fois. <i>Spencermartinsia</i> spp. et <i>Dothiorella sarmentorum</i> ont été utilisées comme outgroup....	118
Figure 45	<i>Diplodia seriata</i>	121
Figure 46	<i>Lasiodiplodia</i> sp.....	122
Figure 47	<i>Neofusicoccum parvum</i>	124
Figure 48	<i>Neofusicoccum mediterraneum</i>	125
Figure 49	<i>Neofusicoccum australe</i>	126
Figure 50	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	126
Figure 51	Profils MSP-PCR des isolats de <i>Phaeomoniella</i> spp. générés par l'amorce M13 après séparations par électrophorèses dans des gels d'agarose à 1,5%, à	128

	80V pendant 3H30mn.....	128
Figure 52	Produits d'amplification de la région ITS des 16 isolats <i>Phaeoconiella</i> spp. Par les amorces ITS1 et ITS4.....	128
Figure 53	Un des deux arbres phylogénétiques obtenus par maximum de parcimonie à partir des séquences ITS (TL = 1518 pas, CI = 0,756, RI = 0,858, HI = 0,244). Les nombres sur les lignes sont les valeurs bootstrap supérieures à 70% avec un rééchantillonnage de 1000 fois. Les espèces présentes en Algérie sont représentées en gras. <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> a été utilisée comme outgroup.....	129
Figure 54	<i>Phaeoconiella chlamydozpora</i>	131
Figure 55	Profils MSP-PCR des isolats d' <i>Eutypa</i> spp. générés par l'amorce M13 après séparations par électrophorèses dans des gels d'agarose à 1,5%, à 80V pendant 3H30mn.....	133
Figure 56	Produits d'amplification de la région ITS des 9 isolats d' <i>Eutypa</i> spp. par les amorces ITS1 et ITS4.....	135
Figure 57	Un des deux arbres phylogénétiques obtenus par maximum de parcimonie à partir des séquences ITS (TL = 200 pas, CI = 0,785, RI = 0,215, HI = 0,930). Les nombres sur les lignes sont les valeurs bootstrap supérieures à 70% avec un rééchantillonnage de 1000 fois. Les espèces présentes en Algérie sont représentées en gras. <i>Diatrype</i> spp. a été utilisée comme outgroup.....	136
Figure 58	<i>Eutypa lata</i>	136
Figure 59	Profils MSP-PCR des isolats de <i>Fomitiporia</i> spp. générés par l'amorce M13 après séparations par électrophorèses dans des gels d'agarose à 1,5%, à 80V pendant 3H30mn.....	138
Figure 60	Produits d'amplification de la région ITS des isolats <i>Fomitiporia</i> spp. par les amorces ITS1 et ITS4.....	137
Figure 61	62 Un des deux arbres phylogénétiques obtenus par maximum de parcimonie à partir des séquences ITS (TL = 1995 pas, CI = 0,668, RI = 0,857, HI = 0,332). Les nombres sur les lignes sont les valeurs bootstrap supérieures à 70% avec un rééchantillonnage de 1000 fois. Les espèces présentes en Algérie sont représentées en gras. <i>Fomes fomentarius</i> et <i>Spongipellis pachyodon</i> ont été utilisées comme outgroup.....	140

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Caractéristiques des vignobles prospectés.....	33
Tableau 2	Echelle d'évaluation des symptômes d'eutypiose (Péros, 1995).....	35
Tableau 3	Echelle de notation des symptômes d'esca.....	35
Tableau 4	Etat sanitaire du cep et le code correspondant.....	36
Tableau 5	Caractéristiques morphologiques des différents genres.....	42
Tableau 6	Amorces utilisées pour la caractérisation moléculaire des isolats.....	44
Tableau 7	Conditions d'amplification de la MSP-PCR.....	46
Tableau 8	Conditions d'amplification des ITS.....	47
Tableau 9	Conditions d'amplification du facteur EF1- α	48
Tableau 10	Conditions d'amplification du gène de la β -tubuline.....	49
Tableau 11	Conditions d'amplification du gène de l'actine.....	49
Tableau 12	Numéros d'accèsion à GenBank et données des espèces de <i>Phaeoacremonium</i> spp. utilisées pour la reconstruction des arbres phylogénétiques.....	51

Tableau 13	Numéros d'accèsion à GenBank et données des espèces de <i>Diplodia</i> et <i>Lasiodiplodia</i> utilisées pour la reconstruction des arbres phylogénétiques	
Tableau 14	Numéros d'accèsion à GenBank et données des espèces de <i>Fusicoccum</i> et <i>Neofusicoccum</i> utilisées pour la reconstruction des arbres phylogénétiques	53
Tableau 15	Numéros d'accèsion à GenBank et données des espèces de <i>Phaeomoniella</i> utilisées pour la reconstruction des arbres phylogénétiques.....	55
Tableau 16	Numéros d'accèsion à GenBank et données des espèces d' <i>Eutypa</i> utilisées pour la reconstruction des arbres phylogénétiques.....	55
Tableau 17	Numéros d'accèsion à GenBank et données des espèces de <i>Fomitiporia</i> utilisées pour la reconstruction des arbres phylogénétiques.....	57
Tableau 18	Données des espèces outgroups utilisées pour la reconstruction des arbres phylogénétiques.....	58
Tableau 19	Parcelles, année de prospection et nombre de ceps considéré.....	61
Tableau 20	Parcelles CHA et CHB, une année d'observation (1000 ceps).....	70
Tableau 21	Nombre de ceps correspondant aux dix transitions entre la première et la deuxième année (parcelles CHE, CHG, CHH (1500 ceps).....	75
Tableau 22	Nombre de ceps correspondant aux dix transitions 2006/2007 (parcelles CHC, CHD, CHF, CHI et CHJ (2500 ceps).....	76
Tableau 23	Nombre de ceps correspondant aux dix transitions 2007/2008 (parcelles CHC, CHD, CHF, CHI et CHJ (2500 ceps).....	77
Tableau 24	Nombre de ceps correspondant aux dix transitions 2006/2008 (parcelles CHC, CHD, CHF, CHI et CHJ (2500 ceps).....	77
Tableau 25	pourcentage de ceps examinés par symptômes au niveau de la végétation en relation avec les nécroses observées dans le tronc et les bras (%).....	77
Tableau 26	Pourcentage de ceps examinés par symptômes au niveau de la végétation en relation avec les nécroses observées dans le bois (%).....	87
Tableau 27	Nombre et fréquence des agents fongiques isolés.....	88
Tableau 28	Origines, codes et identification des <i>Phaeoacremonium</i> spp.....	89
Tableau 29	Origines, codes et identification des <i>Botryosphaeriaceae</i>	90
Tableau 30	Origines, codes et identification de <i>Phaeomoniella</i> spp.....	92
Tableau 31	Origines, codes et identification d' <i>Eutypa</i> spp.....	94
Tableau 32	Origines, codes et identification des <i>Fomitiporia</i> spp.....	95
Tableau 33	Nombre d'agents fongiques isolés à partir des nécroses des troncs et des bras des ceps dépéris.....	96
Tableau 34	Numéros d'accèsion à GenBank et données des espèces de <i>Phaeoacremonium</i> isolées dans cette étude.....	103
Tableau 35	Fréquences d'isolement des espèces <i>Phaeoacremonium</i> spp.....	104
Tableau 36	Les espèces <i>Phaeoacremonium</i> spp. isolées à partir des nécroses des troncs et des bras des ceps dépéris.....	105
Tableau 37	Fréquences d'isolement des <i>Botryosphaeriaceae</i>	105
Tableau 38	Les espèces des <i>Botryosphaeriaceae</i> isolés à partir des nécroses des troncs et des bras des ceps dépéris.....	119

RESUME

Les maladies du bois, en particulier l'esca et l'eutypiose, sont considérées parmi les plus graves affections de la vigne, car elles affectent laproductivité etlalongévitédes vignobles.

En Algérie, peu de connaissances existent quant à l'importance et à l'étiologie de ces maladies. Une étude épidémiologique conduite au niveau de dix vignobles, où 5000 ceps ont été suivis durant trois années consécutives, a montré la présence de symptômes typiques de l'eutypiose et de l'esca. Elles se caractérisent par des formes plus ou moins sévères allant jusqu'à l'apoplexie ou par des formes lentes conduisant à l'affaiblissement progressif de la plante, pour aboutir à la mort d'une de ses parties, puis à sa totalité.

La présence des symptômes typiques d'eutypiose a été observée dans l'ensemble des parcelles à des taux qui varient de 2,8% à 21%; en moyenne 11,5% des ceps étaient atteints. Les symptômes de l'esca ont également été observés dans toutes les parcelles avec des taux allant de 0,4% à 4,4% avec un taux moyen de 1,9%. La mortalité a atteint 27,5% ; signifiant que plus d'un quart des vignes était absent.

L'analyse de la dynamique spatio-temporelle des données épidémiologiques a montré que l'eutypiose est la principale maladie du bois en expression des symptômes et en nuisibilité dans les différentes parcelles, c'est aussi l'une des principales causes de la mortalité observée durant les trois années. Les tests statistiques de l'analyse du nombre de lien utilisée pour l'étude de l'association spatiale de la mortalité et l'expression des symptômes d'eutypiose et d'esca, a montré une répartition aléatoire des ceps morts ou malades. Toutefois une agrégation a été notée dans certaines parcelles, pour les ceps eutypiés mais limitée au ceps directement voisin sur le rang.

L'analyse de 200 ceps exprimant les symptômes d'eutypiose et d'esca, montre plusieurs types de nécroses dans le bois; la nécrose brune et dure en position sectorielle est la plus rencontré avec 59,5%. Les isolements réalisés à partir de ces différentes lésions vasculaires, ont permis d'établir une collection de 368 isolats. Une relation entre les nécroses du bois et chaque agent fongique isolé a été mise en évidence.

La caractérisation taxonomique de l'ensemble des isolats obtenus grâce au génotypage par la technique MSP-PCR (Microsatellite-Primed PCR) a permis d'organiser chacun des genres, en groupes homogènes suivant leurs empreintes génétiques. Les analyses phylogénétiques et phénotypiques ont mis en évidence l'implication, dans ces pathosystèmes, de 15 espèces, isolées à différentes fréquences. Quatre espèces appartenant au genre *Phaeoacremonium* (30,5%) à savoir, *Pm aleophilum*, *Pm parasiticum*, *Pm venezuelense* et *Pm hispanicum*, identifiées sur la base des séquences des gènes de la β -tubuline et de l'actine. *Eutypa lata* agent de l'eutypiose et *Phaeomoniella chlamydospora* sont les seules espèces appartenant respectivement aux genres *Eutypa* (30%) et *Phaeomoniella* (60%), identifiées sur la base des séquences ITS. Six espèces appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae* (52%) ont été identifiées sur la base des séquences des gènes ITS et du facteur d'élongation EF-1 α , à savoir, *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia* sp., *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum australe*, *Neofusicoccum mediterraneum* et *Botryosphaeria dothidea*. Trois espèces appartenant aux Basidiomycètes (11,5%) ont été identifiées sur la base des séquences ITS, à savoir, *Fomitiporia mediterranea*, *Phellinus mori* et *Fomitiporella* spp..

Mots clés : Eutypiose, esca, épidémiologie, taxonomie, génotypage, phylogénie

ABSTRACT

Trunk diseases, especially Eutypa dieback and esca, are considered among the most serious diseases of the vine, as they affect the productivity and the longevity of vineyards. In Algeria, little knowledge exists about the importance and the etiology of these diseases. An epidemiological study conducted in ten vineyards where 5000 vines were monitored for three consecutive years, showed the presence of typical symptoms of Eutypa dieback and esca that occur in mild or severe forms, leading to the death of the vines.

The presence of typical symptoms of Eutypa dieback was observed in all plots at rates ranging from 2.8% to 21%, with an average of 11.5%. Esca symptoms were also observed in all plots with rates ranging from 0.4% to 4.4% with an average of 1.9%. The mortality reached 27.5%, meaning that more than quarter of the vines was absent.

The spatio-temporal analysis of the epidemiological data showed that Eutypa dieback is the main trunk disease in symptoms expression and harmfulness in the different plots; it's also one of the main causes of mortality observed during the three years of the survey. Statistical tests with join count analysis used to study the spatial association of mortality and expression of Eutypa dieback and esca symptoms showed a random distribution of dead or diseased vines. However, aggregation was detected in some plots for vines with Eutypa dieback symptoms but limited to vines directly neighboring on the row.

The analysis of 200 vines with Eutypa dieback and esca symptoms shows several types of necrosis. The most frequent lesion was a brown hard necrosis in a sectorial position identified in 59.5%, of the vines. Isolations made from these vascular lesions, have established a collection of 368 isolates. A relationship between wood necrosis and each fungal isolated was highlighted.

Taxonomic characterization of all isolates with genotyping technique by MSP-PCR (Microsatellite-Primed PCR) was used to organize each of the genera, into homogeneous groups according to their DNA fingerprinting. Phenotypic and phylogenetic analyzes revealed the involvement in these pathosystems, of 15 species isolated at different frequencies. Four *Phaeoacremonium* species (30.5%), were identified on the basis of the partial sequences of the β -tubulin and actin genes, named *Pm aleophilum*, *Pm parasiticum*, *Pm venezuelense* and *Pm hispanicum*. *Eutypa lata* the agent of Eutypa dieback and *Phaeomoniella chlamydospora* are the only species belonging to the genera *Eutypa* (30%) and *Phaeomoniella* (60%) respectively, identified on the basis of ITS sequences. Six species belonging to the Botryosphaeriaceae (52%) were identified on the basis of the ITS and elongation factor EF-1 α genes, namely *Diplodia seriata*, *Lasiodyplodia* sp., *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum australe*, *Neofusicoccum mediterraneum* and *Botryosphaeria dothidea*. Three species belonging to Basidiomycetes (11.5%) were identified based on ITS sequences, namely *Fomitiporia mediterranea*, *Phellinus mori* and *Fomitiporella* spp.

Keywords: Eutypa dieback, esca, epidemiology, taxonomy, genotyping, phylogeny

ملخص

أمراض جذوع الأشجار، خاصة الأتيبيوز و الإسكا منها، يعدان من أخطر الأمراض الفطرية التي تصيب الكروم، لتأثيرهما البالغ على عمر و منتوج الكرمة. و على الرغم من الاكتشاف المبكر لهذين المرضين، إلا أن الأبحاث فيهما في الجزائر قليلة جدا، إن لم نقل نادرة.

أظهرت الدراسة الوبائية التي أجريت على مستوى عشرة حقول، حيث تمت معاينة و متابعة 5000 كرمة، و لمدة ثلاث سنوات متتالية وجود أمراض خاصة بمرضي الأتيبيوز و الإسكا، هذه الأمراض تتفاوت في خطورتها مؤدية إلى الاحتراق، أو الضعف التدريجي للنبته لتؤدي بها إلى الموت الجزئي ثم لتقضي عليها نهائيا. الأمراض الخاصة بمرض الإسكا شوهدت في مجمل الحقول التي خضت بالمعاينة و التلقيح بنسب تتراوح بين 2,8% و 21%، ليبلغ معدل الحقول المصابة 11,5%. كما أن أمراض مرض الإسكا لوحظت أيضا في مجمل حقول الدراسة بنسب تتراوح بين 0,4% و 4,4% معدل نسبي بلغ 1,9%، ليبلغ معدل معدل الوفيات 27,5%. مما يدل على أن أكثر من ربع الكروم تلفت.

تحليل البيانات المكانية و الزمانية للمعطيات الإبيديميولوجية، أظهرت أن الأتيبيوز يعد المرض الرئيس للجذع بالنظر إلى أعراضه أو إلى الأضرار التي يسببها في مختلف الحقول، كما يعد واحد من الأسباب الرئيسة للموت المشاهدة خلال الثلاث سنوات من المعاينة. الإحصائيات التي قمنا بها و المستخدمة أساسا لمعاينة تفاعل الروابط المكانية للموت و أمراض الأتيبيوز و الإسكا، أظهرت توزيعا عشوائيا للكروم المصابة أو المرض. في حين، مرض الأتيبيوز و تجمّع في بعض الحقول المصابة و المتجاورة أو اللصيقة.

معاينة 200 كرمة مصابة بأمراض الأتيبيوز و الإسكا أظهرت وجود أنواع جديدة من التلف، و كان أكثرها انتشارا، و بالتحديد بنسبة 59,5% التلف الجزئي ذو اللون البني، و الذي تتلخّ النبته. العزلات التي قمنا بها و المستخلصة من هذه النخور المسجلة مكّنتنا من جمع 368 نوعا من الفطريات، و حدّد لنا بوضوح العلاقة بين أنواع تلف الجذع و بين الفطريات المعزولة.

تصنيف مختلف العزلات التي تمّ الحصول عليها من خلال تقنية التنميط الجيني بتقنية

(MSP-PCR (Microsatellite-Primed PCR) مكّنتنا من تنظيم كل نوع منها إلى مجموعات متجانسة وفقا لخصائصها الوراثية. تحاليل كل من المظهر الخارجي و الحمض النووي مكّنتنا من اكتشاف 15 نوعا بنسب مختلفة، 4 منها تنتمي إلى نوع (*Phaeoacremonium* (30,5%) و هي: *Pm aleophilum*, *Pm parasiticum*, *Pm venezuelense* و *Pm hispanicum* و التي حدّد على أساس تسلسل β - tubuline و actine الجين.

Eutypa lata مسبب الأتيبيوز و *Phaeomoniella chlamydospora* يعدان الفطريان الوحيدان اللذان ينتميان إلى نوع (*Eutypa* (30%) و (*Phaeomoniella* (60%) و التي تمّ التعرف عليهما على أساس تسلسل الجينات ITS.

سنة أنواع تنتمي إلى عائلة (*Botryosphaeriaceae* (52%) تمّ تحديدها على أساس تسلسل الجين ITS و إلى عامل الاستطالة EF-1 α و هي: *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia sp.*, *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum*

Botryosphaeria dothidea و *australe*, *Neofusicoccum mediterraneum*

ثلاثة أنواع تنتمي إلى Basidiomycètes (11,5%) تمّ أيضا تحديدها عن طريق تسلسل الجين ITS و هي: *Fomitiporia*

Fomitiporella spp. و *mediterranea*, *Phellinus mori*

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La culture de la vigne en Afrique du Nord s'est pendant longtemps limitée à une production très marginale de raisin de table. En Algérie, le vignoble s'est ensuite fortement développé à partir de la fin du XIXe siècle. Cette extension est due à la réduction du vignoble européen sous les effets du phylloxera et à une meilleure maîtrise de la vinification en pays chaud. La vigne couvrait près de 400 000 hectares et l'Algérie assurait alors le huitième de la production de vin dans la zone méditerranéenne (Hildebert, 1949). La viticulture occupe actuellement encore une place de choix au sein de l'agriculture algérienne avec 82,743 hectares presque équitablement partagés entre raisins de table et raisins de cuve (M.A.D.R., 2009).

La vigne, comme toute plante est sujette à de nombreuses attaques de ravageurs et de maladies, notamment celles générées par des champignons pathogènes. Ces derniers peuvent s'attaquer à toutes les parties de la plante en détruisant partiellement les cultures et sont à l'origine de beaucoup de problèmes économiques. C'est le cas de l'oïdium, le mildiou, le black-rot, l'excoriose et diverses autres pathologies d'origine fongiques (Galet, 1999).

Sans doute, les dépérissements de la vigne constituent une affection très redoutable qui préoccupe depuis toujours les vignerons. L'esca et l'eutypiose sont les deux maladies fongiques en recrudescence provoquant des dépérissements de la vigne. Il s'agit des plus graves affections de cette plante, car elles s'attaquent à la charpente de la souche dont elles provoquent la mort à plus ou moins court terme. Les champignons responsables de ces maladies sont lignivores ; ils pénètrent principalement par les plaies de taille, ainsi que par d'autres blessures accidentelles et se développent lentement dans le bois des ceps. Compte tenu du développement lent et irrégulier de ses pathogènes, ces maladies passent inaperçues au début de l'attaque, mais leur évolution n'en est pas moins inexorable et leur impact économique très important (Dubos, 2002 et Larignon, 2012).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de moyens de lutte efficaces contre l'esca et l'eutypiose, d'où le risque qu'elles deviennent le problème phytosanitaire le plus important des vignobles où seules les mesures d'ordre prophylactique sont envisagées pour lutter contre ces maladies.

Le syndrome de l'esca constitue une affection très ancienne de la vigne, qui existe à l'état endémique dans tous les vignobles et plus particulièrement dans ceux des pays du pourtour méditerranéen (Viala, 1926; Mugnai *et al.*, 1999). L'esca occasionne un dépérissement et une mortalité anticipée dans les parcelles atteintes. Les symptômes externes comportent des nécroses très caractéristiques entre les nervures des feuilles et le dessèchement d'une partie ou de l'ensemble des rameaux. Le terme « apoplexie » est utilisé lorsque l'ensemble du cep est concerné par un dessèchement brutal survenant généralement au cours d'une période chaude. A l'intérieur du tronc, le bois présente différentes nécroses, dont une lésion claire et tendre, appelée amadou (Larignon *et al.*, 2009).

L'interdiction de l'emploi de l'arsénite de sodium en Europe, seul traitement chimique capable de limiter l'esca de la vigne (Hewitt, 1952 et Desaché *et al.*, 1995), a entraîné un développement récent des recherches sur cette maladie. Ces travaux ont permis de montrer que plusieurs champignons étaient associés au processus de dégradation du bois. Les plus fréquents sont *Eutypa lata*, *Phaeomoniella chlamydospora*, plusieurs espèces de *Phaeoacremonium*, ainsi que des espèces de la famille des *Botryosphaeriaceae*. Elles débiteraient la dégradation du bois et faciliteraient l'action lignivore du basidiomycète *Fomitiporia mediterranea* qui est responsable de la pourriture blanche (Fischer, 2002 ;Essakhi *et al.*, 2008; Gramaje *et al.*, 2009 et Phillips et Alves, 2009).

Eutypa lata est également décrit comme agent d'un autre dépérissement de la vigne : l'eutypiose (Carter, 1991). Cette maladie est également appelée maladie du bras mort, car elle provoque une mortalité des coursons qui n'affectent souvent qu'une partie du cep. Ce champignon colonise le bois à partir des plaies de taille ; le bois devient dur et cassant montrant une nécrose sectorielle. Il provoque également un rabougrissement des rameaux avec des entre-nœuds raccourcis portant des feuilles nécrosées de taille réduite. Ces symptômes apparaissent plusieurs années après la contamination et sont plus facilement visibles au début de la végétation.

En Algérie, des cas d'apoplexie avaient été signalés par Debray (1892) mais la description des symptômes ne permet pas de savoir s'il s'agit bien d'esca. Ravaz (1905) a également signalé des taux élevés de mortalité dans de nombreuses régions viticoles de l'Algérie. Selon cet auteur, la vigueur des vignes et un climat propice, sont des facteurs impliqués dans ces dépérissements. En revanche, Kien (1920) a signalé en Tunisie l'envahissement du tronc de souches mortes ou partiellement sèches par le champignon *Polyporus igniarius* ou

amadouvier qui devait être en fait *F. mediterranea*. Quant à l'eutypiose, aucune donnée n'était disponible sur son importance en Algérie jusqu'en 2003, où une enquête préliminaire a été entreprise dans plusieurs régions viticoles. Cette enquête a révélé un pourcentage élevé de vignes mortes ainsi que la présence de l'esca et l'eutypiose dans les différents vignobles prospectés (Berraf et Peros, 2005). L'enquête a montré que l'eutypiose est plus fréquente que l'esca, avec 37% des vignes touchées par l'eutypiose et 15% par l'esca et que le symptôme du bras mort est principalement dû à l'eutypiose. Ces derniers auteurs ont noté que les pourcentages de symptômes foliaires d'eutypiose et d'esca, déjà particulièrement inquiétants, sont probablement inférieurs aux pourcentages réels de ceps atteints. En effet, ces derniers ne présentent pas les symptômes chaque année et un cumul sur plusieurs années est nécessaire pour approcher la gravité réelle de l'eutypiose (Peros, 1999) et de l'esca (Hewitt, 1957; Surico *et al.*, 2000a).

Devant la gravité de ces maladies, l'objectif de la présente étude est d'acquérir des connaissances sur l'importance de l'eutypiose et de l'esca au niveau du sahel algérois et contribuer à l'étude taxonomique et phylogénétique des différentes espèces inféodées aux dépérissements. C'est dans cette thématique que nous avons entamé nos travaux qui portent sur deux grands axes :

Un suivi de l'évolution de l'eutypiose et de l'esca par une série d'enquêtes sur trois années consécutives. Les deux maladies sont observées chaque année à deux périodes différentes du stade de développement de la vigne (fin mai-début juin pour l'eutypiose et le mois d'août pour l'esca) ; la mortalité au niveau des parcelles est également quantifiée. Ces prospections ont pour objectifs de :

- Dresser un état des lieux de la répartition, de la fréquence et de l'intensité de l'expression des symptômes foliaires des deux principales maladies du bois : l'esca et l'eutypiose, dans les vignobles prospectés.
- Etudier la répartition spatio-temporelle des dépérissements dans ces vignobles et leur expansion au cours des trois années d'étude par des approches épidémiologiques à l'aide du Logiciel « R-PROJECT ».

INTRODUCTION

Le deuxième axe porte sur une caractérisation de la diversité fongique responsable de l'eutypiose et le syndrome de l'esca. Ce deuxième volet consiste à :

- Collecter des ceps de vigne présentant des symptômes typiques de l'esca et l'eutypiose et décrire les différentes nécroses retrouvées à l'intérieur du tronc et des bras. Localiser précisément les prélèvements au niveau de chaque nécrose pour pouvoir éventuellement relier la couleur du bois et sa texture, à la présence de chaque agent fongique.
- Isoler et caractériser l'ensemble de la collection par un génotypage en utilisant la technique MSP-PCR (Microsatellite Primed Polymerase Chain Reaction) permettant ainsi, un premier regroupement des isolats, suivant leurs empreintes génétiques.
- Séquencer la région ITS, les gènes du facteur d'élongation de traduction $EF1\alpha$, les β -tubulines et l'actine (choisis de manière spécifique pour chaque genre identifié) d'isolats représentatifs de chaque groupe génétique.
- Construire des arbres phylogénétiques sur la base des différentes séquences nucléotidiques.
- Caractériser les phénotypes en se basant sur les caractères micro-morphologiques des isolats représentatifs des différents clades phylogénétiques.

CHAPITRE I.
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Les maladies fongiques vasculaires ou maladies du bois

Les maladies du bois sont considérées comme très dommageables pour la pérennité du patrimoine viticole car les champignons responsables de ces maladies attaquent les organes pérennes de la vigne, provoquant à plus ou moins court terme la mort du cep. Dans le vignoble, elles se manifestent par différentes symptomatologies au niveau de la partie herbacée. Elles peuvent se caractériser par des formes plus ou moins sévères allant jusqu'à l'apoplexie ou par des formes lentes conduisant à l'affaiblissement progressif de la plante (perte de vigueur), pour aboutir à la mort d'une de ses parties (coursions, bras), puis à sa totalité (Larignon, 2012).

Les opérations de taille chez la vigne, sont d'une première importance pour sa formation et sa fructification. Ainsi, chaque année les plaies de taille constituent des ouvertures exposant les ceps à des attaques par une panoplie de micro-organismes. Dans ces attaques, il y'a des colonisateurs primaires ou pionniers, surtout d'origine fongique ou bactérienne. Ces attaques primaires engendrent l'installation d'autres agents parasites et opportunistes secondaires entraînant la décomposition progressive des tissus ligneux. La conséquence de ces actions primaires et secondaires est le dépérissement du cep (Boubals et Mur, 1990 et Grosclaude, 1993).

2. Eutypiose

L'eutypiose est une maladie de dépérissement, due au champignon ascomycète *Eutypa lata* (Pers.) Tul. & C. Tul. Elle cause des dommages très importants dans les vignobles sous forme de ceps partiellement affaiblis ou même morts prématurément (Boubals et Mur, 1990). Cette maladie est actuellement considérée parmi les maladies les plus graves de la vigne. En effet, elle sévit dans pratiquement toutes les régions viticoles du monde (Carter, 1991 ; Trouillas et al., 2011).

2.1. Taxonomie et phylogénie de l'agent pathogène

Le genre *Eutypa* (Ascomycota, Sordariomycetidae, Xylariales, *Diatrypaceae*) a été décrit pour la première fois en 1863 par Tulasne et Tulasne (Carmaran et al., 2006). Le premier cas signalant la pathogénicité d'une espèce du genre *Eutypa* date de 1933. Sur des plants d'abricotier (*Prunus armeniaca*), Samuel (1933) a isolé un champignon du genre

Cytosporina responsable d'une maladie appelée «Gummosis» ou «Dieback» ou encore «Dying arm disease». Les travaux d'Adam (1938) et Carter (1957) portant sur la caractérisation taxonomique de ce champignon, ont montré par l'observation de la forme imparfaite, nommée *Cytosporina* puis *Libertella blepharis*, que le champignon responsable appartenait au genre *Eutypa* auquel il donnait le nom d'espèce *armeniaca*.

Après un examen exhaustif du genre *Eutypa*, *Eutypa armeniaca* a été considéré comme synonyme d'*Eutypalata*, ainsi, Rappaz (1984), attribue définitivement le nom d'*Eutypa lata* (Pers : Fr.) Tul & C.Tul. au champignon responsable de l'eutypiose en hommage de Tulasne qui a réalisé sa première description en 1863. Rolshausen *et al.* (2006) et Trouillas *et al.* (2011) ont complété l'étude morphologique par des tests biochimiques et des analyses phylogénétiques (Fig. 1).

Initialement, l'abricotier était considéré comme seule plante hôte de cet agent fongique. D'autres travaux ont mis en évidence la réceptivité de plus de 88 plantes hôtes ligneuses appartenant à 28 familles botaniques, de ce champignon, réparties dans le monde entier (Carter *et al.*, 1982 ; Bolay et Carter, 1985 et Munkvold *et al.*, 1994). *Eutypa lata* a notamment été observée sur le prunier (Carter et Moller, 1971), la vigne (Boley et Moller, 1977), le citronnier (Kouyeas, 1978), le pêcher, l'amandier (Carter 1982), le pommier (Glawe *et al.*, 1983), le pistachier (Rumbos, 1986) et l'olivier (Rumbos, 1993).

Les Diatrypaceae sont rencontrées partout dans le monde et comprennent un certain nombre d'agents pathogènes des plantes ligneuses, des forêts et des espèces d'arbres d'ornement. Malgré les difficultés taxonomiques au sein de cette famille, l'intérêt pour les *Diatrypaceae* a récemment augmenté, principalement en raison de la récente découverte de ces champignons dans différentes régions viticoles (Trouillas *et al.*, 2010). Les espèces des *Diatrypaceae* sont généralement considérées comme des saprophytes, bien que certaines espèces appartenant à cette famille constituent de graves agents pathogènes. Parmi ces espèces, *Eutypa lata* (Pers.) Tul. & C. Tul. (syn.: *E. armeniaca* Hansf. & Carter) agent causal de l'eutypiose, *Cryptosphaeria lignyota* (Fr.) Auersw. (syn.: *C. populina* (Pers.) Sacc.) et *Eutypella parasitica* R.W. Davidson & R.C. Lorenz, sont aussi considérées comme de graves agents pathogènes des arbres forestiers aux États-Unis et en Europe (Davidson et Lorenz 1938, Hinds 1981, Jurc *et al.*, 2006).

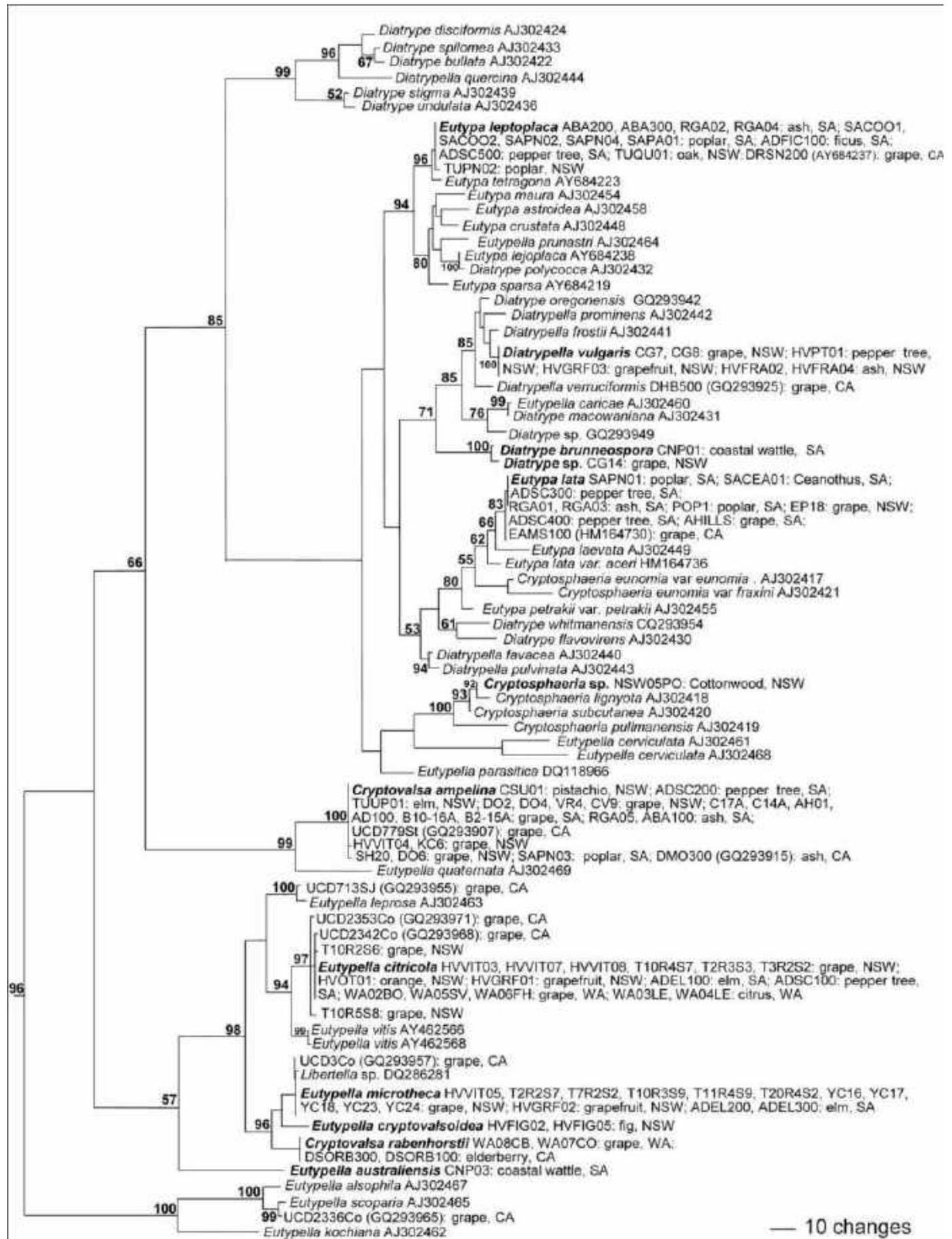


Fig. 1. Un des 36 Arbres phylogénétiques des Diatrypeaceae obtenus par maximum de parcimonie à partir des séquences ITS (TL =1518 pas, CI = 0.4302, RI = 0.7444, RC = 0.3202). Les nombres sur les lignes sont les valeurs Bootstrap supérieures à 50% avec un rééchantillonnage de 1000 fois. Les espèces présentes en Australie sont représentées en gras (Trouillas et al., 2011).

En Californie, 11 espèces appartenant à cette famille ont été récemment identifiées sur *Vitis vinifera* et d'autres plantes-hôtes ligneuses (Trouillas et Gubler, 2004 et Trouillas *et al.*, 2010). Des études récentes aux États-Unis suggèrent une corrélation possible entre l'infection de la vigne par des espèces des *Diatrypaceae* et la présence des périthèces sur les plantes hôtes naturelles et d'ornement dans les écosystèmes environnants, souvent à proximité des vignobles (Trouillas et Gubler 2010; Trouillas *et al.*, 2010). En Argentine, la diversité des *Diatrypaceae* a également été étudiée et de nouvelles espèces ont été proposées (Carmaran *et al.*, 2009).

La taxonomie des *Diatrypaceae* a été révisée et des descriptions morphologiques de 13 genres et plus de 220 espèces ont été faites, comprenant les genres les plus communs, *Eutypa* Tul. & C. Tul., *Cryptosphaeria* Ces. & De Pas., *Cryptovalsa* (Ces. & De Pas.), *Diatrype* Fr., *Diatrypella* (Ces. & De Not.) De Not., et *Eutypella* (Nitschke) Sacc. (Rappaz, 1987 ; Mostert *et al.*, 2004 et Luque *et al.*, 2006).

La classification des *Diatrypaceae* suggérée par Rappaz (1987) est fondée principalement sur les caractères des téléomorphes y compris la morphologie des stromas et l'organisation des périthèces. Cependant, beaucoup de chevauchements au niveau des caractères taxonomiques existent entre les genres actuels de cette famille. Vasilyeva et Stephenson (2006) ont reconnu que le concept de *Diatrype* délimitée par Rappaz (1987) est quelque peu problématique, car dans certains cas, il n'y a pas de séparation claire entre ce genre et celui d'*Eutypa* ou *Eutypelléen*. En outre, les classifications phylogénétiques des *Diatrypaceae* basées sur les séquences ITS rDNA (ribosomal internal transcribed spacer) ont été tentées mais les relations évolutives dans cette famille restent incertaines (Acero *et al.*, 2004 ; Trouillas *et al.*, 2010 et Trouillas *et al.*, 2011).

2.2.Répartition et incidence économique de l'eutypiose

L'eutypiose est présente dans la quasi-totalité des vignobles du monde et cause de nombreux problèmes en Australie (Carter, 1973), aux États-Unis (Petzoldt *et al.*, 1983, Bolay et Moller, 1977) en Europe, notamment en France (Bolay, 1986 et Peros *et al.*, 1996) , en Espagne (Luque *et al.*, 2006), au Portugal (Cortesi *et al.*, 2001), en Italie (Cortesi et Milgroom, 2001). En Afrique, la présence de l'eutypiose a été signalée en Afrique du sud (Safodien, 2007) et en Algérie (Berraf et Péros, 2005).

Cette maladie est considérée comme étant la plus grave des maladies actuelles de la vigne. Elle est particulièrement dévastatrice des vignobles dans le monde. Elle se traduit par des

pertes économiques importantes, du fait de la diminution des rendements et de la réduction de la durée de vie des ceps (Amborabé *et al.*, 2005). Selon Le Gall et Le Gat (1994), la réduction du volume de la récolte en début d'attaque dans une parcelle, est difficilement appréciable et varie en fonction du cépage et des conditions culturales. Cette appréciation est d'autant difficile à réaliser, que les vignobles bien entretenus sont toujours en situation de surproduction. En revanche, lorsque le taux de mortalité augmente au sein d'un vignoble, l'impact économique devient important. Cette maladie a aussi des effets indirects sur la qualité en modifiant l'encépagement des vignobles, puisque les variétés sensibles sont peu à peu remplacées par des variétés plus tolérantes (Fallot *et al.*, 1997). Selon Munkvold *et al.*, (1994), la production est liée directement à la sévérité de l'eutypiose, car l'infection provoque une perte des parties herbacées.

L'eutypiose fait l'objet d'une surveillance étroite, différentes enquêtes ont permis de connaître l'étendue de la maladie. En Algérie, les enquêtes réalisées en 2003 dans différentes régions viticoles, ont montré des incidences qui varient de 1,4% à 49,4% (Berraf et Péros, 2005). Une situation similaire a été signalée en Australie, où certaines parcelles ont montré des incidences allant de 1,6% à 46,2% (Highet et Wicks, 1998).

2.3.Symptomatologie

L'identification de l'eutypiose s'avère souvent délicate, elle est d'autant plus difficile que les symptômes sont d'apparition lente et complexe. Le plus souvent, des superpositions de symptômes d'origines différentes sont observées (Lardner *et al.*, 2005). L'apparition des symptômes de l'eutypiose nécessite cinq à dix ans après la contamination par *Eutypa lata* (Dubos, 1994 ; Long *et al.*, 2003), ce qui rend le diagnostic de la maladie difficile à un stade précoce (Moller et Kasimatis, 1978 ; Rolshausen *et al.*, 2008).

2.3.1. Au niveau des rameaux herbacés

Les premiers symptômes perceptibles s'observent au printemps sur les parties herbacées du cep. Peu après le débourrement, un rabougrissement de la végétation souvent sur une seule partie de la plante est observé (Fig.2 a, b), d'où la maladie du bras mort. D'après Fallot *et al.*, (1997), la maladie affecte un ou deux bras mais elle peut par la suite s'étendre à l'ensemble de la souche conduisant à sa mort. Les jeunes sarments issues d'un bras infecté ont une croissance ralentie et présentent des entre-nœuds très courts, mais toujours réguliers à la différence du Court-noué (Bernard et Mur, 1986 ; Dubos, 1987 et Berraf et Péros, 2005).



Fig.2. *Symptômes d'eutypiose : a, b : aspect rabougri des rameaux (Dubos, 1999) ; c : feuille saine, d : feuille nécrosée (Galet, 1995) e : grappe saine, f : symptômes d'eutypiose sur grappe (Dubos, 2002) ; g : symptôme d'eutypiose (coupe longitudinale) h : nécrose brune et dure sectorielle i : nécrose claire et tendre sectorielle (Larignon, 2009).*

Les feuilles des parties malades présentent des tailles réduites, d'un vert pale, ou encore enroulées et déchiquetées (Fig.2 d). Elles sont souvent déformées, présentant des nécroses marginales pouvant se généraliser à l'ensemble du limbe. Dans les cas graves, les feuilles disparaissent, ne laissant que les pétioles (Petzldt *et al.*, 1981 ; Galet, 1995). Les inflorescences et les grappes, si elles ne se dessèchent pas avant la floraison, elles seront victimes d'une abondante coulure ou d'un millerandage, en développant de petites baies souvent apyrènes (Fig.2 f) (Dubos, 1996).

2.3.2. Au niveau du bois

En hiver, il est facile d'observer la présence du bras mort et des méplats sur le tronc qui correspondent à des zones nécrotiques dont l'origine est une grosse plaie de taille. Sur le bras mort où l'écorce s'est exfoliée, apparaissent des plages grisâtres à noirâtres, bosselées montrant la présence du champignon sous la forme d'un stroma, représentant la forme sexuée dénommée : les périthèces (Dubos, 1999).

Des coupes transversales effectuées sur des bras atteints ou des troncs morts montrent des zones nécrosées de consistance dure, de couleur brune, toujours sectorielles et bien délimitées (Fig.2 h, i) (Mur et Branas, 1991). Les parties nécrosées montrent une apparence de bois mort qui se dégrade en une pourriture sèche de type cubique qui se casse très facilement (Dubos, 1996). Selon Galet (1999), cette nécrose prend toujours naissance à partir d'une blessure qu'elle soit une plaie de taille ou une blessure due à un accident mécanique. Elle s'enfonce profondément dans les tissus du bois, et peut se propager au delà du bourrelet de greffe, ce qui empêche le mouvement de l'eau et des éléments nutritifs dans la plante (Moller et Lehoczky, 1980).

2.4. Biologie de l'agent causal

Deux types de reproduction sont à différencier pour l'eutypiose, la forme asexuée ou anamorphe dénommée *Libertella blepharis* et la forme sexuée ou téléomorphe dénommée *Eutypa lata*. Sur des milieux de culture gélosés et à des températures de 20 à 25°C, le champignon forme des colonies de couleur blanche et vigoureuses. L'abondance des filaments mycéliens donne un aspect échevelé à la culture. Le mycélium devient plus dense en vieillissant et se mélanise partiellement. Après 6 à 8 semaines de culture il peut produire des fructifications asexuées (Bolay, 1985 ; Galet, 1995).

2.4.1. Forme asexuée : *Libertella blepharis* A.L.Smith

Elle apparaît à la surface des bois infectés lorsque l'humidité est élevée. Elle précède ou accompagne le développement des fructifications sexuées (Bolay et Moller, 1977). Des pycnides noirâtres et globuleux, émettent des cirrhes jaunâtres contenant une multitude de conidies, qui sont filiformes, arquées hyalines et ont une longueur qui varie selon les isolats, de 16 à 45 μm (Figure 6) (Bolay, 1986). Belarbi (1983) puis Ju *et al.*, (1991) ont observé la germination des conidies sur milieu artificiel après exposition aux rayons proches des ultra-violet, toutefois, leur fonction dans le cycle infectieux reste inconnue. Selon Cortesi et Milgroom (2001), les pycnides ne semblent pas jouer de rôle dans la propagation de la maladie.

2.4.2. Forme sexuée : *Eutypa lata* (Pers.)Tul& C.Tul

Elle assure la dissémination de la maladie. Elle se développe sous l'écorce 2 à 5 ans après la contamination sous forme d'un stroma noirâtre d'aspect bosselé. Ce dernier contient les fructifications ou périthèces qui ne peuvent se développer que dans les régions où la pluviométrie annuelle dépasse 350 mm (Bolay et Moller, 1977). Les périthèces sont des fructifications globuleuses de 300 à 500 μm de diamètre, prolongées par un col très court et terminé par un ostiole s'ouvrant par un pore. Les loges des périthèces contiennent de nombreux asques et des filaments stériles appelés paraphyses (Figure 4) (Bolay, 1984). Les asques cylindro-calviformes se composent d'une partie fertile (30 x 4-5 μm) et d'un pédicelle (70 - 120 μm) et se terminent par un anneau apical (Carter et Talbot, 1974). Dans chacun des asques, huit ascospores allantoïdes, brun jaune, aux parois minces, mesurant 6,2 - 11 μm x 1,5 - 2 μm sont dénombrés (Figure 7). Ces périthèces, après une période de maturation deviennent fructifères. A maturité, le stroma peut contenir des périthèces fertiles pendant 5 ans ou plus, en formant de nouvelles fructifications chaque hiver (Murs et Branas, 1991 et Trouillas *et al.*, 2010).

2.4.3. Cycle infectieux

Les ascospores constituent l'inoculum infectieux et sont l'unique moyen de propagation de la maladie. Elles sont libérées des périthèces sous l'action de la pluie et véhiculées par le vent (Carter, 1957). D'après Paillassa *et al.* (1992) et Chapuis *et al.* (1998), le seuil minimum déclenchant la libération des spores est de 0,5 mm de pluie. Dubos (1987), a montré que le début de la libération des spores a lieu dans les deux heures qui suivent le début de la pluie et qu'elle dure environ 36 heures, temps nécessaire pour vider les périthèces de leurs spores. La maturation des ascospores ne peut avoir lieu qu'après 10 à 12 jours de l'épuisement des périthèces (Paillassa *et al.*, 1992). La dissémination par le vent de la sporée s'effectue sur de

grandes distances pouvant atteindre 60 Km. Les sites d'infection se situent dans la direction des vents dominants (Ramos *et al.*, 1975). Les portes d'entrée des spores sont les blessures du bois, essentiellement les plaies de taille mais aussi les plaies dûes au gel, à la grêle et à la vendange mécanique (Carter, 1991). Au niveau des blessures, il existe des forces de succion qui entraînent les ascospores dans les vaisseaux du bois. Selon le même auteur, ces ascospores s'engouffrent facilement dans les vaisseaux du bois grâce à leur petite taille et leur surface gluante qui leur confère une grande capacité d'adhésion. Elles germent dans une zone située à 4 ou 7 mm de profondeur (Dubos, 1999). La sensibilité des blessures à l'infection diminue avec le temps, car la surface de ces lésions est colonisée par des micro-organismes saprophytes antagonistes qui rentrent en compétition avec *Eutypa lata* et gênent son développement (Chapuis, 1995). En outre, plus la taille est tardive, moins les plaies sont sensibles aux contaminations par les ascospores, car la sève montante gêne leur pénétration (Petzoldt *et al.*, 1981 ; Dubos, 1994 ; Mukvold *et al.*, 1994).

2.4.4. Diversité génétique d'*Eutypa lata*

Plusieurs études ont évalué la variabilité génétique au sein des populations d'*Eutypa lata* en utilisant un grand choix de techniques. Des différences d'agressivité entre les isolats ont été démontrés grâce aux observations réalisées sur des boutures de Cabernet-Sauvignon inoculées (Péros et Berger, 1994 et Sosnowski *et al.*, 2007). La technique RAPD (random amplified polymorphism DNA) a été utilisée pour évaluer la variabilité à l'intérieur et entre les populations d'*Eutypa lata*, confirmant l'existence d'une variabilité au niveau régional, à l'échelle de la parcelle et même au niveau du cep (Péros *et al.*, 1997 ; Péros et Larignon, 1998 ; Péros *et al.*, 1999 ; Cortesi et Milgroom, 2001).

D'autres études ont également analysé la structure de la population d'*E. lata* à diverses échelles géographiques, allant d'une population d'un vignoble aux populations de différents continents. Les études ont montré des niveaux élevés de variabilité génétique entre les populations d'*E. lata* d'Europe, d'Australie et d'Amérique du Nord à l'aide de marqueurs RAPD (random amplified polymorphism DNA), les marqueurs AFLP (amplified fragment length polymorphism), les marqueurs RFLP (restriction fragment length polymorphism) et les séquences ITS (ribosomal DNA internal transcribed spacer) (Peros *et al.*, 1996 ; Peros *et al.*, 1997 ; Péros *et al.*, 1999 ; Peros et Berger, 2003 ; DeScenzo *et al.*, 1999 ; Lardner *et al.*, 2007 et Trouillas *et al.*, 2010).

3. Le syndrome de l'esca

L'esca est une maladie fongique qui existe depuis très longtemps et sévit dans tous les pays où la culture de la vigne est présente. Il s'agit d'une de ses plus graves affections car elle s'attaque aux organes pérennes entraînant à plus ou moins long terme la mort du cep. L'esca est causée par un complexe de champignons, qui, selon certaines observations, infectent la plante successivement dans différentes parties du tissu ligneux (Larignon et Dubos, 1987; Sparapano *et al.*, 2001a; Calzarano et Di Marco, 2007). Les travaux de recherche sur l'esca ont conduit à la formulation de nouvelles hypothèses sur ce que la maladie a été ou pourrait être. Graniti *et al.* (2000), Graniti (2006) et Surico (2009) ont discuté de la théorie selon laquelle l'esca existe comme un complexe de maladies ou encore comme une maladie complexe. Les recherches ont montré que l'esca peut s'expliquer par deux scénarios possibles : soit, ce serait une « maladie complexe », selon laquelle un certain nombre de champignons et d'autres facteurs interagissent et produisent un syndrome général, soit, un « complexe d'au moins deux maladies, impliquant une trachéomycose caractérisée par une nécrose brune du bois et une pourriture blanche. Selon l'endroit où l'infection a débuté (en pépinière ou dans le vignoble); et la prédominance et l'ordre dans lequel le champignon infecte la vigne et devient actif, au moins cinq syndromes ont été décrits :

1. La nécrose brune du bois, qui s'observe en particulier dans les porte-greffes de boutures greffés et sans symptômes externes;
2. La maladie de Petri, connue anciennement sous différentes appellations anglo-saxonnes « Black goo », « Slow dieback », « Slow decline » et « *Phaeoacremonium* grapevine decline » et qui affectent les très jeunes vignes;
3. Young esca ou jeune esca (trachéomycose) caractérisé par des ponctuations foncées dans le bois (correspondant à des vaisseaux nécrosés), parfois avec la présence de petites zones de nécrose noire et dure, et des symptômes typiques de l'esca sur les feuilles (tigrures des feuilles).
4. La pourriture blanche qui correspond une nécrose claire et tendre au niveau du bois.
5. Esca proper ou esca proprement dit (n'est que la cooccurrence de deux syndromes existants dans le complexe, le jeune esca et la pourriture blanche). Quant à la succession d'événements qui conduisent à l'esca proper (et l'apoplexie), il est considéré que la maladie débute dans la pépinière et se poursuit dans le vignoble en la maladie de Petri ou jeune esca et éventuellement en esca proprement dit (Surico, 2001 et Surico *et al.*, 2006).

3.2. Champignons impliqués dans le syndrome de l'esca

Les champignons associés à l'esca, ainsi que leurs fréquences varient selon les pays. Divers travaux réalisés en France (Péros *et al.*, 2000) Italie (Mugnai *et al.*, 1996) Turquie (Erkan, 2000), Australie (Pasco, 1998), Californie (Chiarappa, 2000) ainsi qu'en Algérie (Berraf et Péros, 2005) montrent l'implication d'une abondante microflore dans la maladie : *Penicillium*, *Alternaria*, *Gliocladium*, *Aspergillus*, *Pestalotia*, *Mycelia sterilia* et même certains agents bactériens. Parmi ces champignons, certains ne sont que des saprophytes ou des parasites secondaires, qui se développent dans le bois déjà attaqué par les espèces responsables de l'esca (Ferreira *et al.*, 1989; Galet, 1999 et Dubos, 2002). Cependant, les champignons pathogènes les plus fréquemment isolés des ceps dépéris sont *Eutypa lata*, responsable de l'eutypiose (Carter, 1991), *Phaeomoniella chlamydospora* (Crous et Gams, 2000), plusieurs espèces de *Phaeoacremonium* (Mostert *et al.*, 2006a; Essakhi *et al.*, 2008; Gramaje *et al.*, 2009), plusieurs espèces des *Botryosphaeriaceae* (Phillips, 2002) et le basidiomycète *Fomitiporia mediterranea* (Fischer, 2002). En Algérie, les genres fongiques présents dans le bois des ceps atteints et montrant des symptômes de dépérissements sont comparables à celles déjà décrites en Europe (Berraf et Peros, 2005).

3.2. Taxonomie et phylogénie des agents pathogènes impliqués dans l'esca

3.2.1. *Phaeomoniella chlamydospora* W.Gams, Crous, M.J.Wingf et L.Mugnai (Crous et W. Gams.)

Le genre *Phaeomoniella* appartient à la famille des Herpotrichillaceae. Il a été récemment introduit pour désigner la seule espèce *Phaeomoniella chlamydospora* impliquée dans le dépérissement de la vigne (Crous et Gams 2000). Ce champignon, désigné tout d'abord sous le nom de *Cephalosporium* sp., est présent dans la plupart des vignobles. Récemment, deux nouvelles espèces, *Phaeomoniella zymoides* et *Phaeomoniella pinifoliorum* ont été isolées de la surface des aiguilles de *Pinus densiflora* en Corée (Lee *et al.*, 2006). Crous *et al.*, (2008) ont isolé *Phaeomoniella capensis*, à partir de feuilles nécrosées d'*Encephalartos* spp. En Afrique du Sud, quatre espèces appartenant à ce genre ont été récemment identifiées sur *Prunus salicina* présentant des symptômes de dépérissement (Damm *et al.*, 2010). À ce jour, aucune structure teleomorphe directement reliée à ce genre n'a été identifiée, et son cycle dans la maladie reste largement méconnu (Tello *et al.*, 2010).

Chez la vigne, *Phaeomoniella chlamydospora* est l'un des champignons pionniers du syndrome de l'esca. Outre, il est l'un des agents associés à la maladie de Petri, affection des jeunes plantations, a été signalée pour la première fois par Petri en 1912 en Sicile (Chiarappa, 1959, Groenewald *et al.*, 2000 et Zanzotto *et al.*, 2001). Ce champignon pénètre par les plaies

de taille lors des périodes douces et pluvieuses. Les différentes plaies réalisées lors des opérations en vert (ébourgeonnage, effeuillage, éclaircissage) peuvent constituer des voies potentielles de sa pénétration (Larignon et Dubos, 2000 et Larignon, 2004). La spore germe au contact d'une plaie, le mycélium se développe au niveau du bois et poursuit sa croissance dans la lumière des vaisseaux (Abreo et *al.*, 2011). Sur une coupe transversale, des nécroses punctiformes caractéristiques sont observées (ou des stries noires en coupes longitudinales). Ce champignon est retrouvé dans la nécrose brune et dure, dans les tissus autour de la pourriture blanche en amadou et au niveau des ponctuations noires en périphérie des nécroses (Berraf et Péros, 2005 ; Péros et *al.*, 2008 et Luque et *al.*, 2009) ; le champignon se propage également par les bois de porte-greffes ou de greffons en pépinière (Giménez-Jaime et *al.*, 2006 et Whiteman et *al.*, 2007). Ceci montre que les boutures de porte-greffe provenant des plants mères infectés sont une source probable d'infection (Pascoe et Cottral 2000 et Aroca et *al.*, 2010). *Phaeomoniella chlamydospora* a également été isolé à partir de vignes asymptomatiques. Des questions ont été soulevées quant à savoir si ce champignon est un endophyte, un agent pathogène latent, ou un véritable pathogène vasculaire. En outre, le mécanisme par lequel il cause le dépérissement est encore débattu (Ridgway et *al.*, 2005). Plusieurs métabolites phytotoxiques isolés à partir de ce champignon ont été identifiés et caractérisés, mais leur rôle dans la pathogénéicité reste incertain (Sparapano et *al.*, 2000a,b, Tabacchi et *al.*, 2000).

Cependant, les analyses moléculaires ont été utiles pour l'identification et le classement de cette espèce dans son actuel taxon (Fig. 3) (Tello et *al.*, 2010). Des amorces spécifiques ont été développées à partir des régions ITS1 et ITS2 et utilisées pour détecter cet agent pathogène dans les vignobles (Groenewald et *al.*, 2000 ; Tegli et *al.*, 2000 ; Whiteman et *al.*, 2003 et Ganzalez et Tello, 2011). Plusieurs études ont aussi analysé la variabilité génétique des populations de *Phaeomoniella chlamydospora* de France, d'Italie, d'Afrique du Sud, de Nouvelle-Zélande et des États-Unis (Tegli et *al.*, 2000, Pottinger et *al.*, 2002). La technique RAPD (random amplified polymorphism DNA) a été utilisée pour évaluer la variabilité à l'intérieur et entre les populations de *Phaeomoniella chlamydospora* (Borie et *al.*, 2002). Un degré assez élevé d'homogénéité a été trouvé parmi les génotypes, au niveau régional et local.

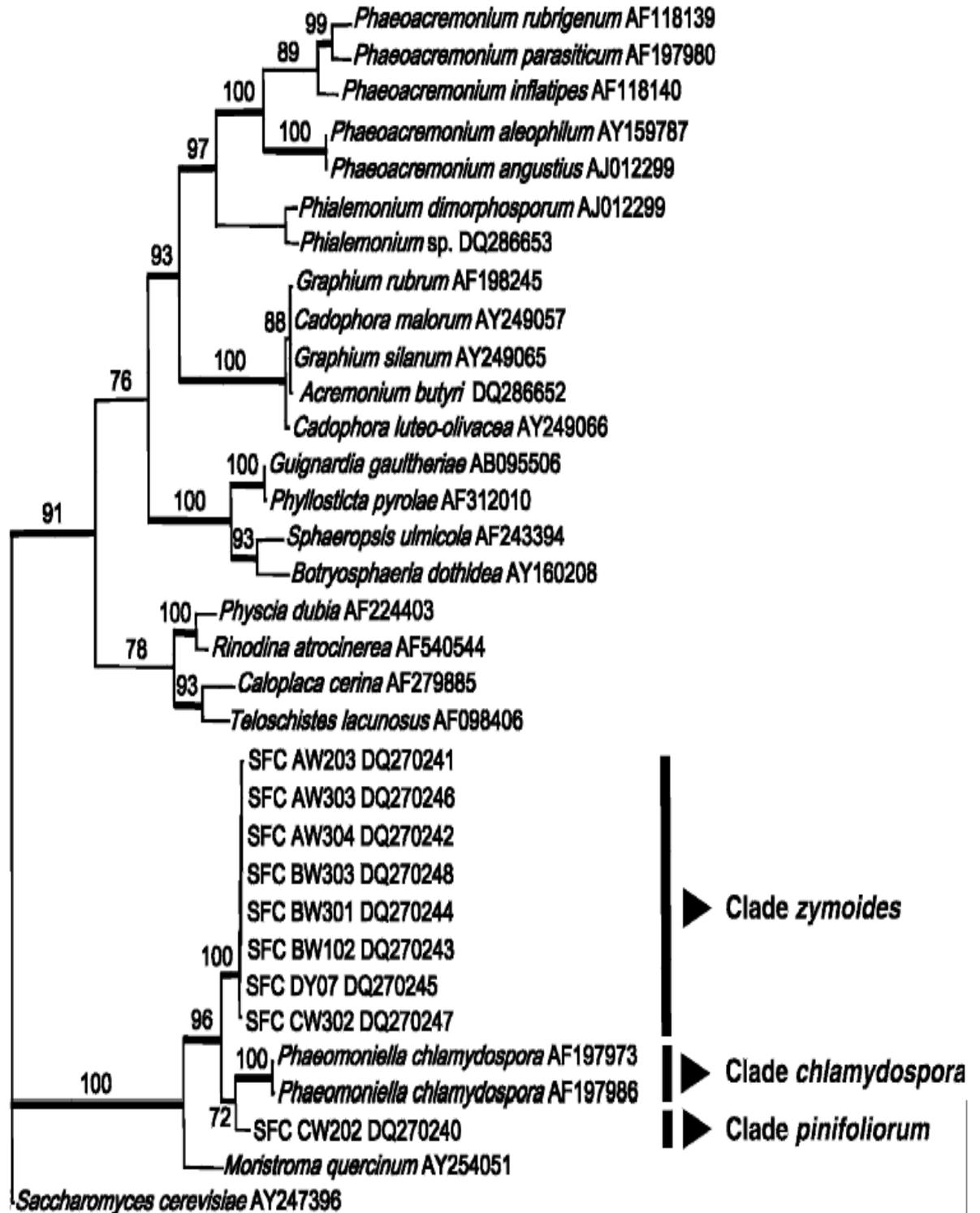


Fig. 3. Un des 2 Arbres phylogénétiques de *Phaeomoniella* spp. obtenus par maximum de parcimonie à partir des séquences ITS (CI 5 0.575, RI 5 0.811, RC 5 0.466, HI 5 0.425). Les nombres sur les lignes sont les valeurs Bootstrap supérieures à 50% avec un rééchantillonnage de 1000 fois. *Saccharomyces cerevisiae* a été utilisée comme outgroup (Lee et al., 2006).

Récemment, Gonzalez et Tello, (2011) et Abreo *et al.* (2011) ont amplifié les séquences ITS (ribosomal DNA internal transcribed spacer), les gènes des β -tubulines et du facteur d'élongation 1- alpha des isolats de *Phaeoconiella chlamydospora* et ont conclu que le faible niveau de variabilité génétique observé, confirme une reproduction asexuée de ce champignon dans le vignoble.

Comont *et al.*, (2010) ont utilisé des marqueurs AFLP pour étudier la structure génétique des populations dans le vignoble français. Un faible niveau de différenciation génétique spatiale a été trouvé, ce qui est compatible avec l'hypothèse de la dissémination de ce champignon *via* le transport de plants infectés sur de longues distances par l'activité humaine.

Phaeoconiella chlamydospora se caractérise par des colonies de couleur vert clair à vert foncé sur milieu malt-agar. Les colonies se développent lentement avec un optimum thermique de 25°C. Les conidiophores sont renflés à leur base et pigmentés. Les conidies sont de forme oblongue à ellipsoïdale, droites et subhyalines. Leur taille est de 2,4 à 6 x 1 à 2 μ m ; la présence de chlamydospores est caractéristique de cette espèce (Crous et Gams, 2000).

3.2.2. *Phaeoacremonium* spp. W.Gams, Crous, M.J.Wingf et L.Mugnai

Le genre *Phaeoacremonium* a été créé par Crous *et al.* (1996) dont *Phaeoacremonium parasiticum* (syn. *Phialophora parasitica* Ajello, Georg & CJK Wang) est désigné comme l'espèce type du genre. Depuis 1996, un total de 34 espèces ont été décrites (Fig. 4) (Crous *et al.*, 1996; Dupont *et al.*, 2000; Groenewald *et al.*, 2001; Mostert *et al.*, 2005, 2006b; Reblova' et Mostert 2007; Damm *et al.*, 2008; Essakhi *et al.*, 2008, Gramaje *et al.*, 2009 et Gramham *et al.*, 2009). Ces espèces ont été isolées à partir d'une grande diversité de plantes ligneuses, mais ont également été trouvés sur des larves de scolytes. Chez l'homme, elles sont à l'origine d'infections de la peau et des ongles appelées Phaeohyphomycoses. Des observations sur plusieurs années ont montré que ce sont des pathogènes opportunistes ayant besoin d'une blessure cutanée et un hôte prédisposé à être infecter pour induire la maladie (Ajello *et al.*, 1974, Crous *et al.*, 1996; Mostert *et al.*, 2006a, Aroca *et al.*, 2008a). Plusieurs espèces thermo tolérantes notamment *Pm. krajdennii*, *Pm. griseorubrum*, *Pm. parasiticum*, *Pm. rubrigenum*, et *Pm. venezuelense* sont associées aux Phaeohyphomycoses chez les humains et ont été isolées à partir de vignes présentant des symptômes d'esca (Guarro *et al.*, 2006 et Mostert *et al.*, 2005). Ces auteurs pensent que les espèces pathogènes pour l'homme pourraient provenir des plantes-hôtes ligneuses.

L'identification des espèces de *Phaeoacremonium* est basée sur les caractères phénotypiques et moléculaires, en amplifiant tout d'abord les ITS (ribosomal DNA internal transcribed spacer) (Dupont *et al.*, 2000), le gène de la β -tubuline (Groenewald *et al.*, 2001 et Aroca *et al.*, 2009) puis des études ultérieures ont inclus les gènes d'activation de l'actine et la calmoduline (Mostert *et al.*, 2006a). Des amorces spécifiques ont été développées sur la base des gènes de la β -tubuline et actine pour l'identification de 22 espèces de *Phaeoacremonium* (Mostert *et al.*, 2006b).

Chez la vigne, les espèces de *Phaeoacremonium* ont été étudiées de manière intensive en raison de leur implication dans la maladie de Pétri et l'esca de la vigne (Mostert *et al.*, 2006a, Aroca *et al.*, 2008). Au total, vingt-cinq espèces ont été isolées à partir de vignes malades, dont *Phaeoacremonium aleophilum*, reconnue comme l'espèce la plus commune sur la vigne à travers le monde (Larignon et Dubos 1997, Mugnai *et al.*, 1999, Mostert *et al.*, 2006b; Essakhi *et al.*, 2008 et Gramaje *et al.*, 2009) et est le plus souvent associée à des symptômes foliaires de l'esca (Larignon et Dubos, 1997 et Peros *et al.*, 2008), avec *Phaeomoniella chlamydospora*, cette espèce est considérée comme pionnière du syndrome de l'esca. A partir de la moelle, elle forme une nécrose brune qui rejoint ensuite *Phaeomoniella chlamydospora* pour former la nécrose centrale brune et dure (Graniti *et al.*, 2000 et Feliciano *et al.*, 2004).

Le genre *Phaeoacremonium* se caractérise par un mycélium brun, composé de branches, avec des hyphes cloisonnés qui se présentent seuls ou en cordons (agrégation de filaments mycéliens). La structure du conidiophore est une caractéristique taxonomique importante, qui permet de distinguer les espèces ayant principalement des conidiophores longs ou fréquemment ramifiés des espèces à conidiophores courts et rarement ramifiés ; les phialides présentent des collerettes en forme d'entonnoir. Elles sont classées selon leur taille, en trois types différents (I, II, III) avec des conidies hyalines de forme oblongue, ellipsoïdale voire allantoïde, droite ou légèrement courbée (Mostert *et al.*, 2006a). La forme sexuée a été confirmée comme étant *Togninia* (Mostert *et al.*, 2003), obtenue *in vitro* pour plusieurs espèces présentes sur les vignes (Mostert *et al.*, 2005 et Damm *et al.*, 2008). En Californie, les périthèces de *Togninia minima* (*Phaeoacremonium aleophilum*), *T. fraxinopennsylvanica* et *T. viticola*, ont été trouvés sur les tissus vasculaires morts et sur les surfaces des plaies de taille (Eskalen *et al.*, 2005a,b; Rooney-Latham *et al.*, 2005a,b). Selon ces auteurs, les ascospores peuvent être une source supplémentaire de l'inoculum. Néanmoins, le degré d'implication de la plupart des espèces de *Phaeoacremonium* dans le dépérissement de la

vigne demeure incertain, où de nombreux aspects devraient être clarifiés (Damm *et al.*, 2008; Essakhi *et al.*, 2008 et Gramaje *et al.*, 2009).

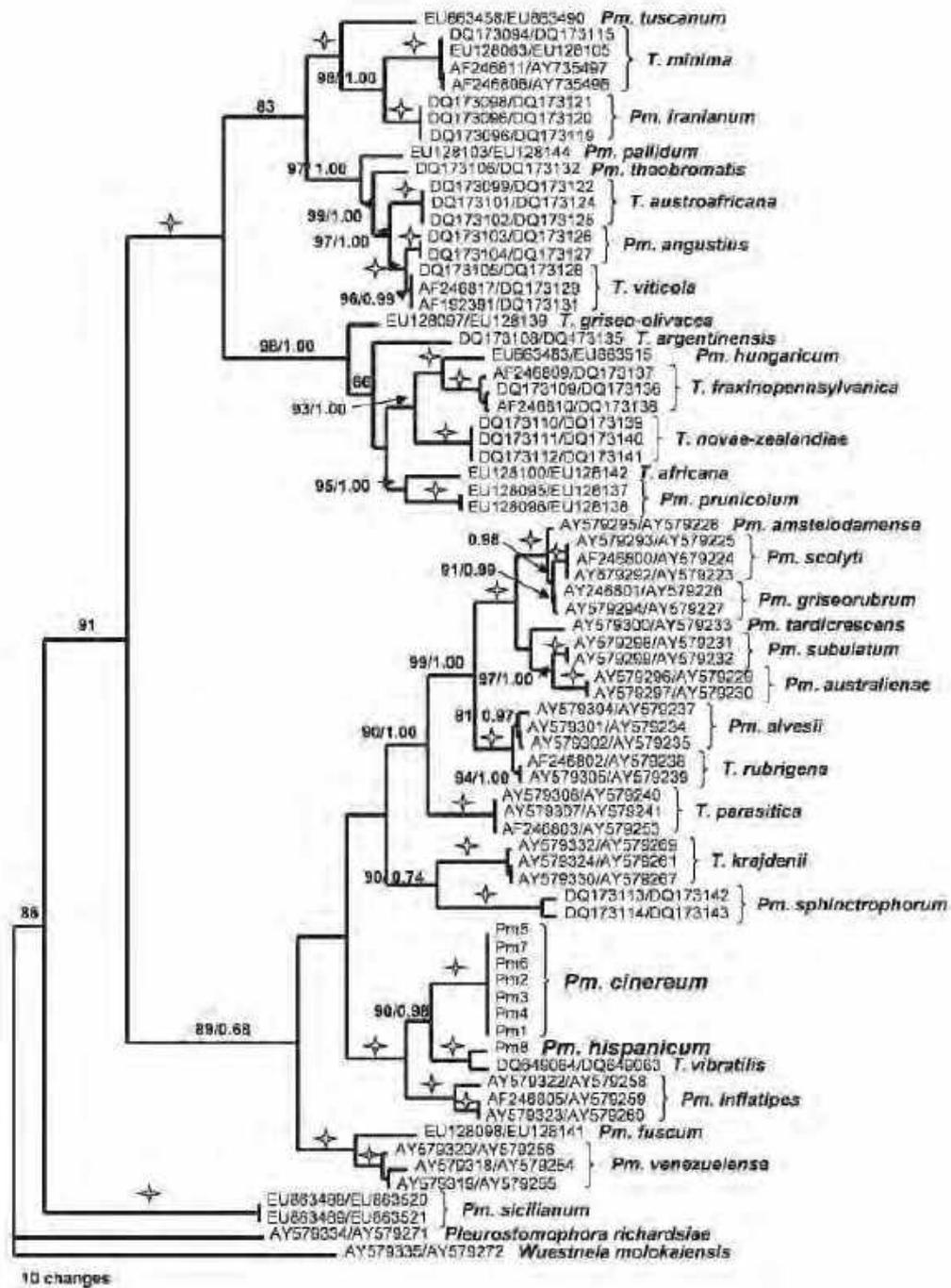


Fig. 4. Un des 42 Arbres phylogénétiques de *Phaeoacremonium* spp. obtenus par maximum de parcimonie à partir de l'alignement combiné des séquences de gènes de TUB et ACT (52477 pas, CI50.491, RI50.834, RC50.410). Les nombres sur les lignes sont les valeurs Bootstrap supérieures à 65% ainsi que les valeurs de probabilité, avec un rééchantillonnage de 1000 fois. *Pleurostomophora richardsiae* and *Wuestneia molokaiensis* ont été utilisées comme outgroup. Le symbole en forme d'étoile indique les valeurs de Bootstrap de 100% (Gramaje *et al.*, 2009).

3.2.3. *Eutypa lata* Pers. Tul. & C. Tul.

Il s'agit du champignon responsable à lui seul de l'eutypiose (cité précédemment) et pouvant être associé à l'esca. En outre, *Eutypa lata* a également été isolée à partir de lésions nécrotiques brunes dans les vignes qui manifestent des symptômes externes typiques de l'esca. Larignon et Dubos (1997) le considèrent comme un des champignons pionniers du syndrome de l'esca, bien qu'il ne soit pas indispensable au développement de ce syndrome. Il est isolé des nécroses brunes sectorielles, ce qui complique encore la nature des facteurs associés à cette maladie (Jamaux-Despréaux *et al.*, 1997; Larignon et Dubos, 1997 ; Peros *et al.*, 2008).

3.2.4. *Fomitiporia mediterranea* M. Fischer

Le genre *Fomitiporia* appartient à la division des Basidiomycota, à la classe des Basidiomycètes, à l'ordre des Hyménochaetales et à la famille des Hyménochaetacées (Dubos, 2002). Chez la vigne, les Basidiomycètes sont généralement considérés comme des pathogènes peu virulents et ont donc suscité peu d'intérêt de la part des chercheurs. Par conséquent, les données relatives à leur diversité et leur distribution dans les différents pays sont limitées (Fischer, 2002; Fischer *et al.*, 2005 et Fischer, 2006). L'implication de basidiomycètes dans le syndrome de l'esca date de très longtemps. Plusieurs études ont montré l'implication de *Phellinus* spp. et dans une moindre mesure *Stereum hirsutum* (Chiarappa, 1959 et Larignon et Dubos, 1997). L'analyse des fructifications de *Phellinus* spp. a montré qu'il s'agit de *Fomitiporia punctata* (Fr.ex Karst.) (Mugnai *et al.*, 1999 et Cortesi *et al.*, 2000). Ainsi, le genre *Fomitiporia* a été considéré l'un des nombreux synonymes taxonomiques de *Phellinus* (Fisher, 1996, Decock *et al.*, 2005 et Decock *et al.*, 2007). Au cours des deux dernières décennies, plusieurs taxons ont été transférés ou décrits dans le genre *Fomitiporia*, en se basant sur les caractères morphologiques ou moléculaires ou bien, la combinaison des deux. (Decock *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2008 et Amalfi *et al.*, 2010). Plusieurs techniques moléculaires ont permis de distinguer les différentes espèces de *Fomitiporia*, comprenant le séquençage de la région ITS, celui des β -tubulines, les LSU rDNA (Fischer, 2002; Pilotti *et al.*, 2005, Dai *et al.*, 2008 et Amalfi *et al.*, 2010) ainsi que les marqueurs RFLP de la région ITS (Fig. 5) (Cortesi *et al.*, 2000 et Pilotti *et al.*, 2005).

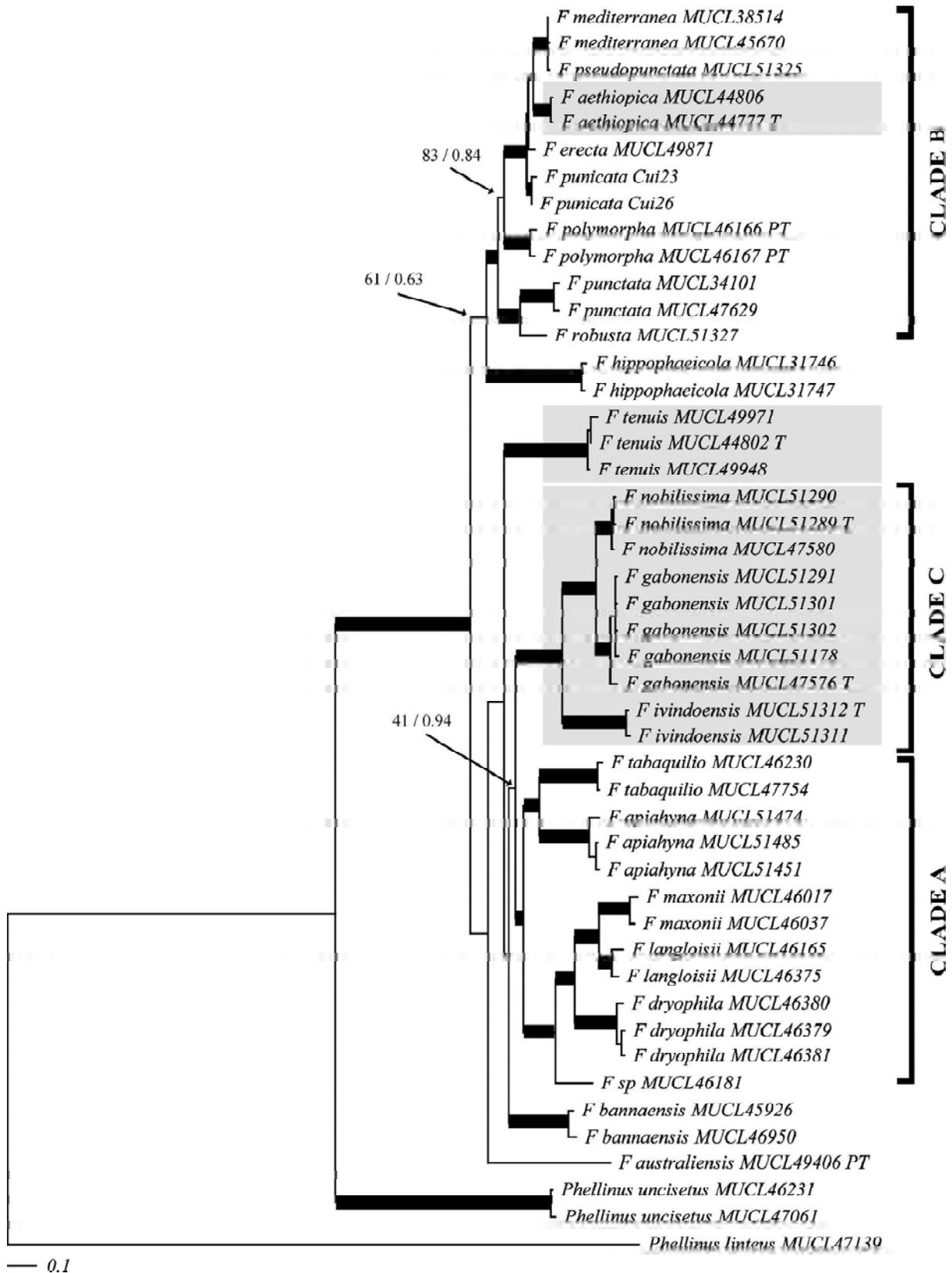


Fig. 5. Arbre consensus de *Fomitiporia* spp. obtenu par la méthode bayésienne à partir de l'alignement combiné des séquences d'ITS, LSU et TEF. Les branches représentées en gras indiquent des valeurs de bootstrap supérieures à 75% ainsi que les valeurs de probabilité supérieures à 0.95. Les taxons africains sont représentés dans un encadrement foncé (T, type; PT, paratype) (Amalfi et al., 2010).

En Europe, *Fomitiporia mediterranea* est la principale espèce associée à l'esca de la vigne. Ce champignon a été classé parmi les champignons de la pourriture blanche, car il dégrade complètement les parois cellulaires pour en faire une structure claire et tendre (« amadou ») (Larignon, 1991 et Fischer et Kassemeyer, 2003). Fischer (2006) signale la présence de *Fomitiporia polymorpha* en Amérique du Nord, *Fomitiporia australiensis* et deux taxons inconnus en Australie, troistaxons inconnus en Afrique du Sud, *Inocutis jamaicensis* et *Fomitiporella vitis* en Amérique du Sud.

Fomitiporia mediterranea est l'espèce qui a la plus large gamme d'hôtes, elle est rencontrée chez les citrus (Elena et al., 2006), le kiwi et l'olivier (Di Marco et al., 2004 et Elena et Paplomatas, 2002) chez lesquels elle manifeste les mêmes symptômes que sur la vigne.

Différentes études ont été conduites en vue d'étudier la variabilité génétique au sein des populations de *F. mediterranea*. La technique RAPD a révélé un faible niveau de différenciation génétique, suggérant la propagation de ce champignon via les basidiospores (Jamaux-Després et Péros, 2003 et Cortesi et al., 2000).

F. mediterranea se manifeste sur les troncs des ceps de vigne par des coussinets irréguliers de quelques centimètres de diamètre. Les basidiospores sont globuleuses, hyalines, lisses et leur diamètre varie de 5 à 6 µm. Les cultures, blanches au début, deviennent très rapidement jaunes à ocre et présentent un aspect velouté (Dubos, 2002).

3.2.5. Les *Botryosphaeriaceae* Theiss.& P. Syd.

Les *Botryosphaeriaceae* constituent une famille d'Ascomycètes qui comporte de nombreuses espèces cosmopolites sur une large gamme d'hôtes (Crous et al., 2006). Elles peuvent être saprophytes ou parasites, connues pour provoquer diverses manifestations et peuvent causer différentes symptomatologies chez de nombreuses hôtes ligneuses (El-Goorani et EL Meleigi, 1972; Lehoczky, 1974; Leavitt et Munnecke, 1987; Phillips, 1998, Smith et al., 1996, Urbez-Torres et al., 2006; van Niekerk et al., 2006; Slippers et Wingfield, 2007 et Pitt et al., 2008). Le genre *Botryosphaeria* (Ascomycota, Dothideomycetidae, Dothideales, Botryosphaeriaceae) a été introduit en 1863 par Cesati et De Notaris et depuis, de nombreuses espèces ont été décrites dans ce genre (Denman et al., 2000 ; Pavlic et al., 2008 et Taylor et al., 2009).

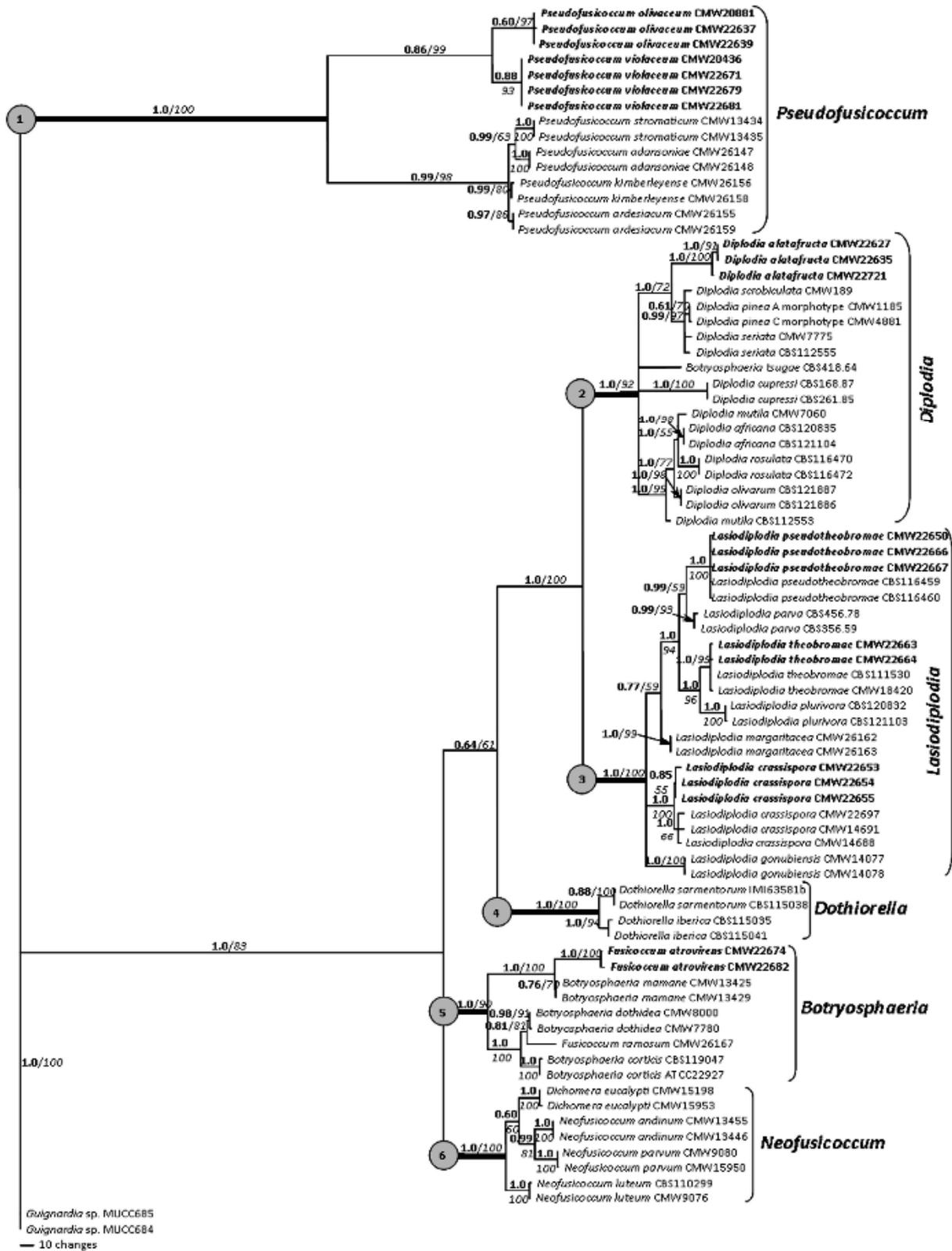


Fig. 6. Un des 416 arbres phylogénétiques des Botryosphaeriaceae obtenus par maximum de parcimonie à partir de l'alignement combiné des séquences d'ITS et TEF après exclusion des caractères informatifs. Les branches représentées en gras indiquent des valeurs de bootstrap supérieures à 50% ainsi que les valeurs de probabilité, avec un rééchantillonnage de 1000 fois. Deux isolats de *Guignardia* sp. ont été utilisées comme outgroup (Mehl et al., 2011).

Récemment, la taxonomie de ce genre a subi une importante révision, suite à une étude moléculaire de Crous *et al.* (2006) qui ont montré que *Botryosphaeria* est composé de dix lignées phylogénétiques qui correspondent à des genres différents et que *Botryosphaeria* est limitée à deux espèces : *B. dothidea* (espèce type de ce genre) et *B. corticis* (Phillips et Alves, 2009). Cependant, les recherches menées au cours de la dernière décennie, ont souligné l'importance des espèces des *Botryosphaeriaceae* comme des agents pathogènes de la vigne dans le monde entier et à ce jour, 18 espèces réparties en 6 genres ont été décrites (Spagnolo *et al.*, 2011). Ces dernières années, les avancées des techniques moléculaires, comme le séquençage de l'ADN (séquences ITS et EF-1 α) ont été utilisées avec succès en association avec les descriptions morphologiques, afin de décrire de nouveaux taxons (Fig. 6) (Denman *et al.*, 2003; Phillips *et al.*, 2005; Abdollahzadeh *et al.*, 2009 et 2010).

3.3.Répartition et incidence économique de l'esca

L'esca est présente dans tous les pays viticoles mais les pays méditerranéens semblent particulièrement touchés. Ainsi la Grèce, l'Italie, l'Espagne, le Portugal et la France montrent des taux d'atteinte important (Mugnai *et al.*, 1999; Fischer, 2006). L'esca occasionne un dépérissement et une mortalité anticipée dans les parcelles atteintes. Elle affecte directement la croissance de la vigne et indirectement la quantité et la qualité des fruits et du vin (Mugnai *et al.*, 1999; Calzarano *et al.*, 2001; Calzarano *et al.*, 2004). Par conséquent, des pertes économiques considérables sont enregistrées sans oublier le coût de remplacement des vignes malades et de ce fait, l'esca constitue une menace pour la pérennité du vignoble (Rumbos et Rumbou, 2001 et Aroca *et al.*, 2008). En Algérie, les observations de différents vignobles ont révélé des taux de dépérissement pouvant être très importants. En effet, 15 % des ceps ont exprimé des symptômes d'esca (Berraf et Peros, 2005).

3.4.Symptomatologie

Selon la nature et l'évolution des symptômes de dépérissement, l'esca présente deux formes différentes :

3.4.1. Forme lente

L'altération du feuillage est le symptôme le plus fréquemment observé. Sur les cépages noirs, apparaissent d'abord de petites taches jaunes à la surface des limbes qui prennent ensuite une teinte rouge en leur centre (Fig. 7a) (Dubos, 1999). Ces taches s'agrandissent, puis fusionnent pour former de plus larges plages. Dans une dernière étape, elles prennent une teinte « feuille

morte », ne laissant qu'une bande rouge et un liseré jaune entre les tissus nécrosés et la partie encore verte. La même évolution peut être observée sur les cépages blancs mais sans présence de coloration rouge. Les tissus desséchés sont alors séparés de la partie saine par une bande jaune (Fig. 7b) (Koklu, 2000 ; Stamp, 2001; Edwards *et al.*, 2001 et Calzarano et Di Marco 2007). Parfois, en l'absence de symptômes sur les feuilles, des taches bleuâtres à noirâtres apparaissent sur les baies ((Fig. 7c). Cette manifestation est très fréquente dans les vignobles de raisin de table en Californie (Chiarappa, 2000 et Vasquez *et al.*, 2007). Il convient de noter l'extrême variabilité de l'expression de ces symptômes d'une année sur l'autre. En effet, un pied malade une année peut très bien, l'année suivante, paraître sain (Dubos, 1999 ; Surico *et al.*, 2000 (a), 2000 (b); Edwards *et al.*, 2001 et Marchi *et al.*, 2006). Selon Sparapano *et al.*, (2001b) et Bruno *et al.* (2007), la plupart des symptômes visibles sur les ceps, peuvent être causés par des toxines, des enzymes ou autres métabolites produits par les champignons et qui se propagent dans le cep, par le biais de la sève.

3.4.2. **Forme foudroyante ou apoplexie**

Cette forme brutale de dépérissement, se manifeste pendant les périodes de fortes chaleurs et souvent à la suite d'un orage. Contrairement à la forme lente, un dessèchement rapide des feuilles, rameaux et grappes survient en l'espace de quelques heures (Fig. 7d) (Mugnai *et al.*, 1999). Dans ces conditions, aucune pousse ne réapparaît l'année suivante. Selon Arnaud et Arnaud (1931), tout se passe comme si le tronc et les bras de la souche avaient été sectionnés. Dans certains cas, les dégâts sont limités à une partie du cep (Larignon et Dubos, 1997 et Mugnai *et al.*, 1999).

L'analyse des ceps malades, en voie de dépérissement, a permis d'observer, par des coupes transversales, deux types de nécroses caractéristiques de l'esca qui se distinguent non seulement par leur position, mais aussi par le nombre de zones qui les constituent (Larignon, 1991 ; Mugnai *et al.*, 1996 ; 1999 ; Péros *et al.*, 1999 et Péros *et al.*, 2000):

- Une nécrose en position centrale qui comprend 3 zones: une zone claire à consistance tendre (amadou), séparée d'une zone brun-rose à consistance dure par un liseré de couleur noire (Fig. 7e).
- Une nécrose en position sectorielle qui comprend deux zones : une zone claire et tendre cernée par une zone brun chamois à consistance dure (Fig. 2i).

Il est important de noter la présence de ponctuations noires, à la périphérie des nécroses (Fig. 7g) (Larignon et Dubos, 1997).

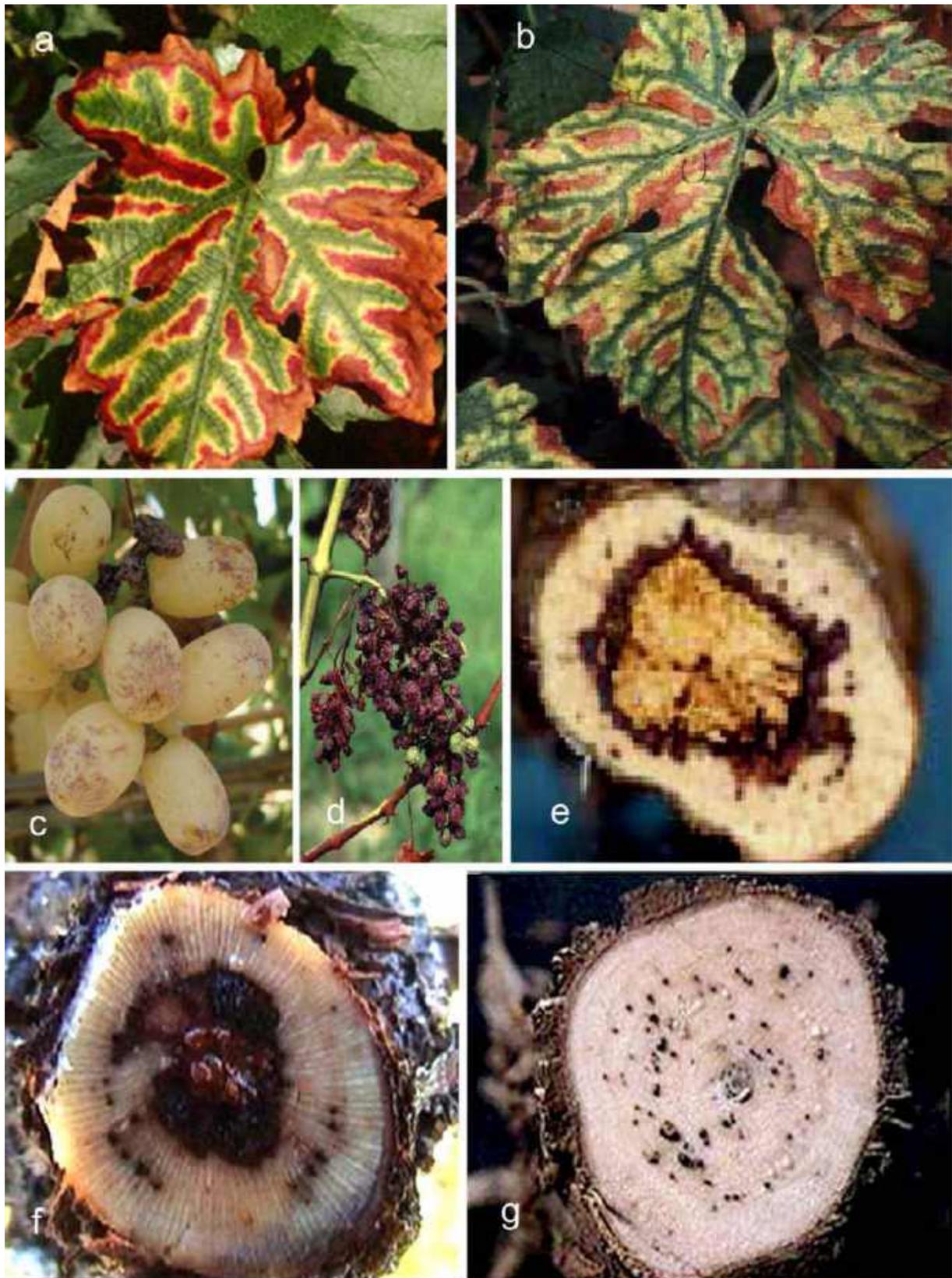


Fig. 7 a : Symptômes d'esca sur feuille de cépage noir ; b : symptômes d'esca sur feuille de cépage blanc (Dubos, 1999) ; c : symptôme d'esca sur les baies ; d : Dessèchement de la grappe ; e : nécrose claire et tendre en position centrale ; f : nécrose brune et dure en position centrale ; g : ponctuations noires (Mugnai et al., 1999).

3.5.Facteurs influençant le développement de l'esca et l'eutypiose

Les conditions climatiques, les pratiques culturales, les cépages, les porte-greffes, la vigueur, et l'âge de la vigne sont des facteurs impliqués directement dans l'incidence de l'esca et l'eutypiose. Selon Péros (1995) et Dubos (2002), La multiplicité des facteurs intervenant dans leur développement rend difficile l'analyse de leurs effets, d'autant plus que certains des facteurs sont indissociables.

3.5.1. Conditions climatiques

Le climat joue un rôle important dans la variation des symptômes foliaires entre les saisons. Les printemps doux et pluvieux favorisent les contaminations et l'expression des symptômes de l'eutypiose. Selon Sosnowski et *al.* (2007), l'augmentation de l'expression des symptômes d'eutypiose est liée aux précipitations hivernales élevées et ont suggéré que la disponibilité accrue en eau peut faciliter le transport des toxines vers les feuilles au printemps.

Comme pour l'eutypiose, le climat semble contribuer à l'expression des symptômes de l'esca. L'apoplexie se manifeste en été, souvent lorsqu'un temps chaud suit une pluie. Selon Dubos, (2002), les vaisseaux du bois qui restent sans compensation de l'évapotranspiration par des apports d'eau, deviennent partiellement ou totalement non fonctionnels. Mugnai *et al.*, (1999) proposent l'hypothèse d'une augmentation de la concentration en toxines, lorsque l'évaporation est élevée. La forme lente de l'esca qui est absente durant la croissance printanière, et complètement visible en été (Mugnai *et al.*, 1996 et Kuntzmann *et al.*, 2010).

3.5.2. Cépages

La plus ou moins grande sensibilité des cépages à la maladie est en relation avec la fréquence et l'intensité d'expression des symptômes en végétation (Chapuis, 1995). Toutefois, vue la complexité des facteurs agissant sur la réceptivité des cépages, il devient difficile d'établir un classement des cépages par rapport à leur réaction vis-à-vis du pathogène. Il est à signaler que la réponse d'un cépage peut dépendre d'un grand nombre de facteurs : caractéristiques des blessures et durée de leur réceptivité, agressivité des souches, résistance à la colonisation (réaction de défense), tolérance aux toxines, aux stress et l'aptitude de compenser les effets du dépérissement (Munkvold *et al.*, 1994 et Schmidt *et al.*, 1999). Selon Péros (1999), cette variabilité dans la réponse des cépages s'explique vraisemblablement par l'existence de seuils, différents selon les cépages, au-delà desquels le dépérissement prend irrémédiablement le dessus. Un cépage tolérant est à même de montrer un niveau très élevé de maladie par suite de stress répétés ou de conditions particulières dans certaines parcelles (Péros, 1995).

3.5.3. Age de la vigne

L'attaque par le champignon peut se faire dès la taille de formation du cep. L'effet de l'âge est déterminant sur le taux de symptômes observé (Le Gall et Le Gat, 1994). Cette hypothèse a été testée sur un échantillon important de 250 parcelles, d'un même cépage et il apparaît que l'âge est corrélé avec l'intensité de la manifestation des symptômes. Ceci est expliqué par le fait que les ceps âgés sont restés plus longtemps exposés aux risques des contaminations (Mimiague et Le Gall, 1994 et Dubos, 2002).

2.6.2. Mode de conduite

En viticulture, le mode de taille adopté détermine l'importance des plaies sur les bras et le tronc. D'une façon générale, toutes les pratiques qui augmentent le nombre et le diamètre des plaies de taille accroissent les risques de contamination par l'eutypiose et l'esca (Dubos, 1987; Péros, 1995 et Mugnai *et al.*, 1999). L'adoption de modes de conduite plus adaptés à la mécanisation, passant du Gobelet traditionnel vers une forme haute palissée en Guyot, laisse d'importantes plaies favorisant ainsi les contaminations (Péros, 1995).

3.5.4. Vigueur

Toutes les causes qui augmentent la vigueur de la plante, particulièrement dans les cinq premières années de plantation, favorisent le développement de la maladie (Dubos, 2002). Les causes les plus souvent rapportées, sont la nature du sol (sols riches et reposés), les fumures excessives (apports azotés) et les portes greffes vigoureux. L'effet de la vigueur pourrait s'expliquer par l'augmentation de la probabilité de l'infection, du fait d'une plus grande surface de plaies de taille (Péros, 1999). Selon cet auteur, la vigueur conférée par le porte-greffe pourrait expliquer l'effet du porte-greffe sur l'expression des symptômes sur le greffon.

3.6.Méthodes de lutte

D'une manière générale, la lutte contre les maladies du bois ne peut se concevoir aussi aisément que pour les maladies des organes aériens. A ce jour, il n'existe pas de méthode de lutte chimique validée au vignoble. Actuellement, l'emploi de fongicides n'exerce que des effets préventifs. Il n'existe aucun produit curatif contre ces champignons. Les moyens de lutte font surtout appel à une gestion des pratiques culturales (Weber *et al.*, 2007).

Les méthodes de lutte pratiquées vis-à-vis de l'eutypiose visent à diminuer l'inoculum disponible par des techniques prophylactiques et optimiser la protection des plaies de taille par des produits chimiques (Galet, 1999 et Larignon, 2004).

Quand à l'esca, le développement de stratégies de lutte efficaces dépend principalement de la compréhension de la biologie et de l'épidémiologie de la maladie. Selon Di Marco *et al.*, (2000), plusieurs caractéristiques de l'esca rendent l'efficacité des moyens de lutte encore plus difficiles. Parmi elles, le type et le rôle des micro-organismes impliqués dans le processus d'infection, le temps nécessaire à l'apparition des symptômes foliaires et la corrélation entre les symptômes foliaires et la détérioration du bois. Par conséquent, la maîtrise de l'esca reste fondée sur la prévention qui réduit les pertes causées par la maladie et limite sa propagation (Larignon *et al.*, 2009).

De nombreuses études visant à la mise au point de traitements phytosanitaires sont en cours : recherche d'antagonistes naturels, composés antifongiques systémiques de synthèse, et de molécules naturelles possédant des propriétés fongicides ou stimulant les réactions de défense des plantes. Néanmoins, ce type de lutte n'est pas très encouragé, vue les difficultés de formulation de spécialités commerciales pour des utilisations à grande échelle et aussi par rapport à leur application qui rend leur utilisation fastidieuse et très onéreuse (Christen *et al.*, 2005 et Halleen *et al.*, 2005).

CHAPITRE II. METHODOLOGIE

CHAPITRE II. METHODOLOGIE

1. SYNOPTIQUE DU SITE D'ETUDE

1.1. Localisation géographique et caractéristiques climatiques

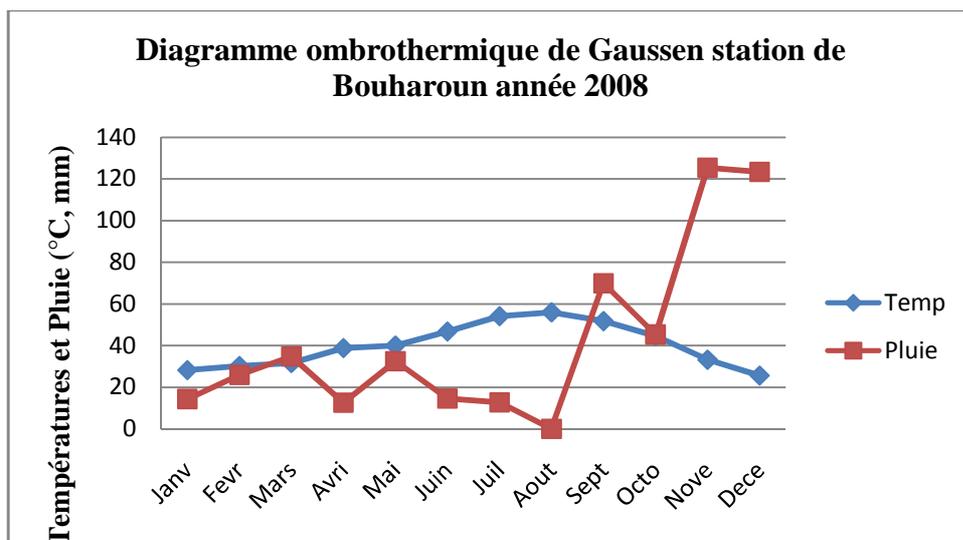
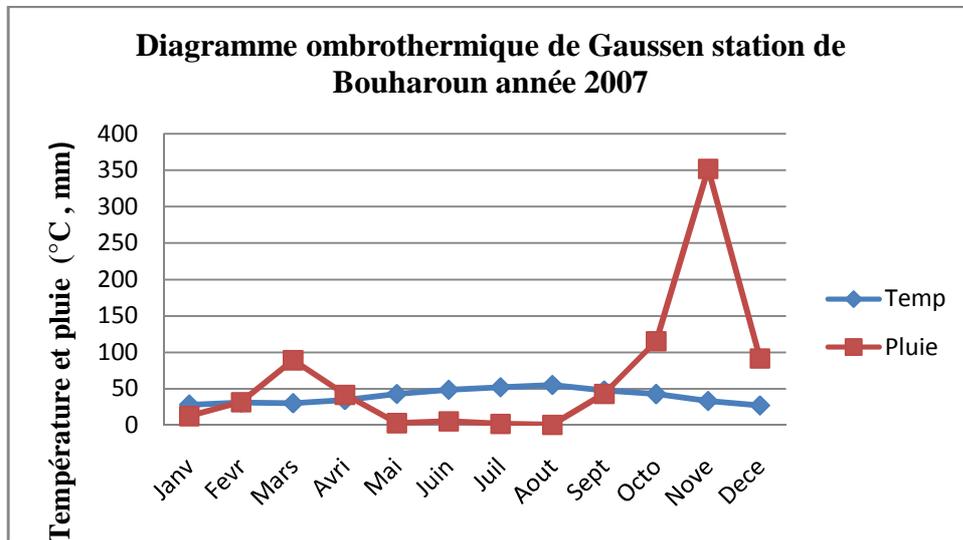
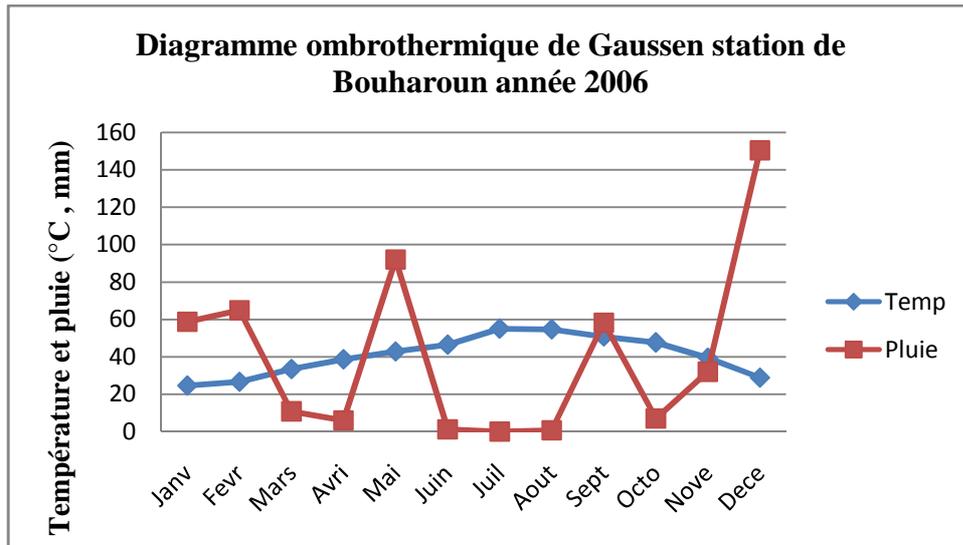
L'étude a été menée au niveau de la région de Tipaza, choisie essentiellement pour sa vocation viticole et plus précisément dans la localité de Hadjout. Cette dernière est située à proximité du littoral méditerranéen, à 75 kilomètres au sud-ouest d'Alger et à 14 km au sud de Tipaza. Elle se trouve sur la plaine de la Mitidja (Fig. 8), une des plus importantes plaines d'Algérie, à vocation essentiellement agricole. Cet écosystème bénéficie d'un climat méditerranéen, caractérisé par un été chaud et sec et un hiver doux et humide. En absence de station météorologique à Hadjout, nous nous sommes référés aux données climatiques de la station de Bouharoun située à une vingtaine de Km du site d'étude (Annexe 1). La figure 9 présente les conditions météorologiques enregistrées durant les années pendant lesquelles l'étude a été menée.



Fig. 8 : Limite géographique de la Mitidja (Mutin, 1977)

(Le cercle vert indique le lieu d'étude)

Les diagrammes ombrothèrmiques permettent de définir les périodes sèches et humides de l'année. Selon Baghnouls et Gaussen (1957), un mois sec se définit par un total pluviométrique (moyenne en mm) égal ou inférieur au double de la température ($P \leq 2T$).



**Fig.9 : Diagrammes ombrothermiques de Gausсен
Année : 2006 - 2007 - 2008**

Les valeurs de températures portées sur l'axe des ordonnées sont le double des valeurs de températures enregistrées à la station de Bouharoun. Les valeurs de précipitations sont également portées sur l'axe des ordonnées. La période est sèche à chaque fois que la courbe des températures passe au-dessus de la courbe des précipitations. Dans le cas inverse, la période est considérée humide. Ainsi, les campagnes agricoles d'étude (2006/ 2007/ 2008) se caractérisent par une saison sèche de 7 mois et une saison humide de 5 mois. Une irrégularité des précipitations inter-mensuelles et interannuelles est constatée. L'année 2007 est la plus pluvieuse, la moyenne pluviométrique atteint 788,9 mm. Seulement 511,3 mm sont enregistrés en 2008 et 481,6 mm en 2006.

1.2. Caractéristiques des parcelles étudiées

Les parcelles ont été plantées vers 1981, et sont constituées d'un seul cépage: le Cinsault cultivé pour la production du vin ; la superficie des parcelles varie de 4 à 20 ha et un seul mode de conduite est adopté: le cordon simple. Ce dernier a été dans certaines parcelles précédé par un mode de conduite en gobelet. Le 41B est le seul porte-greffe utilisé pour toutes les parcelles et l'arsénite de sodium a été utilisé sous forme de Pyralesca (Tabl. 1).

Tableau 1 : Caractéristiques des vignobles prospectés

Parcelles	Caractéristiques				
	Superficie (ha)	Année de plantation	Cépage	Période de la taille	Densité de plantation (m)
CHA	6	1981	Cinsault	Novembre	1 x 3
CHB	10	1981	Cinsault	Décembre	1 x 2
CHC	8	1981	Cinsault	Novembre	1 x 3
CHD	5,5	1981	Cinsault	Novembre	1 x 3
CHE	10	1981	Cinsault	Décembre	1 x 2
CHF	4	1981	Cinsault	Décembre	1 x 3
CHG	4,5	1981	Cinsault	Décembre	1 x 3
CHH	6	1981	Cinsault	Novembre	1,5 x 2.5
CHI	5	1981	Cinsault	Novembre	1,5 x 2.5
CHJ	20	1981	Cinsault	Décembre	1,5 x 2.5

2. EPIDEMIOLOGIE ET REPARTITION SPATIO-TEMPORELLE DE L'EUTYPIOSE ET DE L'ESCA

Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'UMR AGAP (INRA Montpellier) « Diversité et adaptation de la vigne et des espèces méditerranéennes » sous la direction du Dr Péros.

2.1. Méthodologie des enquêtes

L'évaluation de l'eutypiose et de l'esca dans les différents vignobles s'est déroulée sous forme d'enquêtes pluriannuelles. Les prospections ont été entreprises en 2006 et ont été poursuivies en 2007 et 2008. Ces prospections comportent des observations directes des symptômes sur le terrain, permettant ainsi d'établir un état des lieux de la situation des maladies du bois et comprendre la dynamique de développement des symptômes aux vignobles à l'issue des trois années d'enquêtes.

2.1.1. Choix des parcelles et échantillonnage

Les prospections ont concerné 10 vignobles présentant des symptômes de dépérissement et la constitution des échantillons de ceps à observer dans chacune des parcelles a été réalisée aléatoirement. Des études préalables (Mimmiague et Le Gall, 1994 ; Dubos, 2002), ont montré que l'eutypiose et l'esca n'obéissent à aucune loi apparente de répartition dans la parcelle. Dans chaque vignoble nous avons constitué une unité parcellaire représentée par une surface rectangulaire comportant 10 rangs de 50 ceps. Ainsi, pour chaque parcelle, l'observation a porté sur 500 ceps, soit un total atteignant 5 000 ceps pour l'ensemble des 10 parcelles. Pour nos observations et prélèvements, nous avons éliminé les ceps de bordures et afin de repérer facilement les rangs à observer, nous avons procédé au marquage des extrémités de chaque unité parcellaire. La figure 10 donne une représentation schématique du dispositif d'observation.

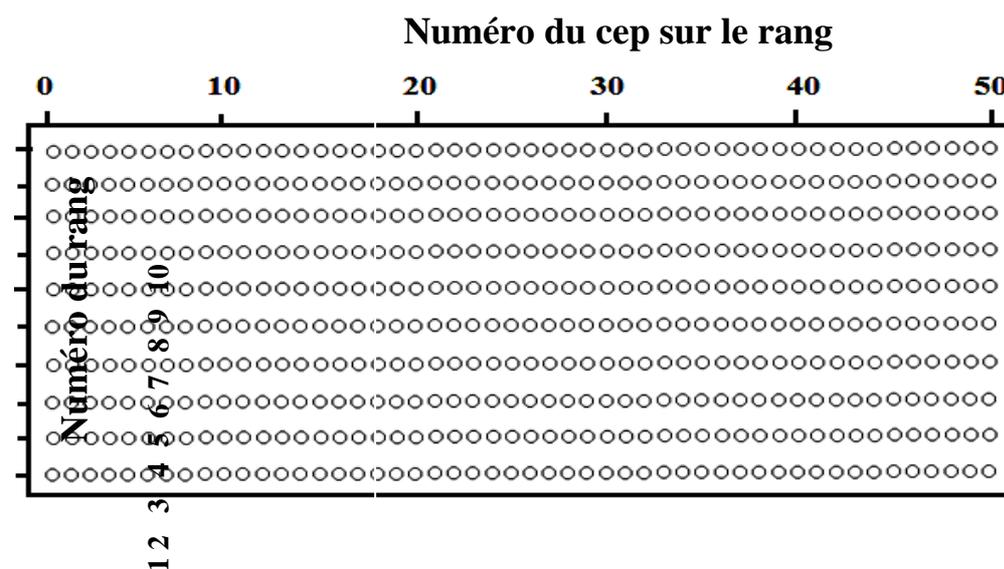


Fig. 10 : Représentation schématique d'une parcelle d'observation

○○○○○○ : ceps de vigne

2.1.2. Echelle d'évaluation de l'eutypiose

La méthodologie suivie est celle décrite par le groupe de travail «Eutypiose-Charentes » pour le suivi de l'eutypiose en France et en Europe, elle a été simplifiée par Péros (1995). Sa particularité réside dans la prise en compte des ceps présentant des anomalies (partie ou totalité du bras mort, courson sans végétation, végétation affaiblie). Cette méthode se compose d'une échelle d'évaluation de cinq indices, allant de l'indice 0 pour les ceps sains à l'indice 4 pour les ceps morts (Tabl. 2).

Tableau 2 :Echelle d'évaluation des symptômes d'eutypiose (Péros, 1995)

Indice	Etat du cep (symptômes)
0	Cep sain
1	Symptômes douteux : rameaux absents ou faibles, partie du bras morte, bras mort.
2	Symptômes limités à une partie du cep, nécroses foliaires, rabougrissement et/ou destructions foliaires.
3	Symptômes généralisés sur l'ensemble du cep.
4	Cep mort, remplacé ou absent

2.1.3. Echelle d'évaluation de l'esca

Les symptômes sont évalués selon l'échelle de notation proposée par Jamaux-Déspréaux *et al.*, (1997). Elle est composée de quatre indices (Tabl. 3).

Tableau 3: Echelle de notation des symptômes d'esca.

Indice	Etat du cep (symptomes)
0	Cep sain
1	Forme lente d'esca
2	Forme foudroyante (apoplexie)
4	Cep mort, remplacé ou absent

2.1.4. Observations et notations des symptômes

Deux observations sont réalisées chaque année. La première est effectuée à la fin du mois de mai, ce qui permet de repérer les symptômes d'eutypiose avant qu'ils ne soient masqués par le développement végétatif de la vigne. La deuxième observation est réalisée le mois d'août, période à laquelle les symptômes d'esca sont plus visibles. L'intensité des symptômes est notée selon l'échelle d'évaluation de chaque maladie (Tabl. 2 et 3). Ainsi, chaque cep aura deux codes qui correspondent aux deux observations de l'année.

Ces codes de notations seront à nouveau recodés de manière à ce que l'état sanitaire de chaque cep soit représenté par un seul code chaque année. Le tableau 4 présente les différents symptômes et les codes correspondants.

Tableau 4 : Etat sanitaire du cep et le code correspondant

Etat du cep		Sain (noté 0)	Bras mort (noté 1)	Eutypiose (noté 2 et 3)	Mort (noté 4)
		A	B	C	M
Sain	0	A0	B0	C0	M
Esca lent	1	A1	B1	C1	M
Apoplexie	2	A2	B2	C2	M
Mort	4	M	M	M	M

Une base de données sous Excel a été créée pour répertorier l'état sanitaire des 5000 ceps durant les trois années d'enquêtes. A partir de cette base de données, il sera possible d'extraire de nombreuses informations telles que les fréquences d'apparition des différents symptômes, le taux de mortalité, les incidences de l'eutypiose et de l'esca.....etc. Les calculs, les graphiques ainsi que les tests statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel R (<http://www.r-project.org/>) qui de par sa gratuité, il permet d'effectuer des traitements divers sur toutes sortes d'informations. Aussi, grâce à cet outil, la dynamique spatiale de l'eutypiose et de l'esca sera conjuguée à la dynamique temporelle dans le but d'analyser la structure de développement de ces maladies du bois à l'échelle d'une parcelle et pour l'ensemble des parcelles prospectées durant les trois années.

2.2. Estimation de l'eutypiose, des bras-morts, de l'esca et de la mortalité

Le taux d'expression des symptômes foliaires correspond au nombre de ceps ayant exprimé un des symptômes (eutypiose, esca ou bras-mort) par rapport au nombre de ceps observés par parcelle et par année. Ainsi :

$$\text{La fréquence de l'eutypiose (\%)} = (\text{ceps notés 2 et 3 du tableau1}) / (\text{ceps observés (500)})$$

$$\text{La fréquence des bras morts (\%)} = (\text{ceps notés 1 du tableau1}) / (\text{ceps observés (500)})$$

$$\text{La fréquence de l'esca (\%)} = (\text{ceps notés 1 et 2 du tableau2}) / (\text{ceps observés (500)})$$

Le taux de mortalité est calculé sur la base des ceps présentant des notations d'indice 4, correspondant au dépérissement total et irréversible du pied de vigne.

La fréquence de la mortalité (%) = (ceps notés 4) / (ceps observés (500))

2.3. Incidence de l'eutypiose

L'évaluation de l'importance réelle de l'eutypiose se fera par rapport au nombre de pieds vivants. Ainsi, selon Péros (1995), l'incidence de l'eutypiose correspond au pourcentage de ceps vivants notés 2 et 3 selon l'échelle (Tabl. 2), par rapport aux ceps totaux observés, soustraits des ceps morts.

Incidence (%) = (ceps notés 2 + ceps notés 3) / (ceps observés – ceps morts)

2.4. Incidence de l'esca

L'incidence correspond au pourcentage de ceps notés 1 et 2 selon l'échelle de Jamaux-Desprésaux *et al.*, (1997) (Tabl. 3), par rapport aux ceps totaux observés soustraits de ceps morts :

Incidence (%) = (ceps notés 1 + ceps notés 2) / (ceps observés – ceps morts)

2.5. Dynamique spatio-temporelle de l'eutypiose, de l'esca et de la mortalité

La dynamique de l'eutypiose et de l'esca peut être observée par des matrices de transition. Une matrice de transition est une matrice carrée décrivant les probabilités de passer d'un état à un autre. Dans chaque rangée sont des probabilités de passer de l'état représenté par cette ligne, aux autres états représentés par des colonnes. Afin de simplifier la matrice, nous avons considéré les ceps codés « B » et « C » (représentés en bleu dans le tableau 4), comme étant des ceps atteints d'eutypiose et les ceps notés « 1 » et « 2 » étant victime du syndrome de l'esca. Ainsi, le nombre de ceps correspondant aux dix transitions : « esca-esca », « esca-eutypiose », « esca-mort », « esca-sain », « eutypiose-eutypiose », « eutypiose-mort », « eutypiose-sain », « mort-mort », « sain-sain » et « sain-mort » entre la première, la deuxième et la troisième année, a été utilisé pour calculer les proportions correspondantes et pouvoir comparer la progression des dépérissements au fil des années. La répartition spatio-temporelle des ceps est représentée sur une cartographie où chaque cep de l'unité parcellaire correspond à une couleur ou un symbole. Ainsi, les ceps sains sont représentés par un cercle

gris, les morts ou les manquants par des points, les ceps eutypifiés par des carrés noirs et les ceps avec des symptômes de l'esca sont représentés par un carré gris.

2.5.1. Analyses statistiques

2.5.1.1. Principe

L'analyse du nombre de liens (Cliff and Ord, 1981) est utilisée pour étudier l'association spatiale pour la mortalité et l'expression des symptômes d'eutypiose et d'esca. Les ceps reçoivent une variable nominale (exemple 0 pour les vivants et 1 pour les morts) et on compare la valeur de la variable d'un cep à un endroit de la parcelle à celle des ceps voisins. Il y a une auto-correlation spatiale positive si les ceps voisins ont tendance à recevoir la même valeur de la variable (par exemple; les ceps morts ont tendance à être groupés et non répartis au hasard sur la parcelle); les ceps sont codés 1 ou 0 selon leur état (mort/vivant, avec/sans symptômes d'eutypiose, avec/sans symptômes d'esca). L'ensemble des notations effectuées à l'aide des codes présentés dans le tableau 4 sont recodées de façon nominale à l'aide de scripts R. Deux ceps de la parcelle peuvent être classés par le type de lien qui les unit: 00, 01 ou 11. Dans la parcelle, les liens entre ceps peuvent être considérés à différentes distances et dans les différentes directions possibles: sur le rang, entre rangs, diagonalement, ou une combinaison de toutes ces directions. Le nombre de liens observés à une distance donnée et pour une orientation donnée est comparé à un nombre théorique obtenu par permutations sous l'hypothèse de l'absence d'autocorrélation c'est à dire en affectant au hasard les ceps dans leurs différents états aux emplacements possibles dans la parcelle. Pour les morts l'ensemble des emplacements a été considéré pour effectuer les permutations alors que pour les ceps exprimant des symptômes, les emplacements correspondant aux manquants ou aux morts ont été retirés des emplacements possibles. Pour chaque permutation, le nombre de liens 11 est déterminé pour chaque classe de distance/orientation et la probabilité d'obtenir cette valeur est obtenue en comparant le nombre observé avec la distribution des 1000 valeurs simulées. Pour détecter des associations significatives, deux tests bilatéraux aux seuils 0,005 et 0,001 ont été utilisés.

2.5.1.2. Réalisation des tests

La préparation des données et l'ensemble des analyses sont effectuées dans l'environnement R ver. 2.14 (R Development Core Team, 2011) dont certains étant adaptés de scripts développés par F. Bonnot (CIRAD) dans le cadre d'études similaires (Oro et *al.*, 2011).

Tout d'abord, l'ensemble des notations effectuées à l'aide des codes présentés dans le tableau 4 sont recodées de façon nominale, soit directement pour les parcelles observées une année, soit après le cumul des observations de maladies pour les parcelles observées plusieurs années. Les nombres de liens observés pour les différentes classes de distance et d'orientation sont calculés et comparés à la distribution obtenue par 1000 permutations. Les tests bilatéraux sont représentés graphiquement sous la forme de 2D-correlogrammes.

3. IDENTIFICATION DES AGENTS PATHOGENES IMPLIQUÉS DANS L'ESCA ET L'EUTYPIOSE DE LA VIGNE

3.1. Prélèvement des ceps à analyser

Un total de 200 ceps a été prélevé afin de rechercher les agents pathogènes incriminés dans le dépérissement. Dans chacune des 10 parcelles, en dehors des unités parcellaires observées pour l'incidence des dépérissements, 20 ceps présentant les symptômes typiques de l'esca et de l'eutypiose (soit 10 ceps pour chaque symptôme) sont sectionnés à la base du tronc.

Chaque cep est examiné au laboratoire selon des coupes transversales et longitudinales afin de suivre l'évolution des nécroses présentes à l'intérieur du tronc et des bras. Un schéma descriptif de l'échantillon a été réalisé dans le but de localiser précisément les prélèvements et pouvoir éventuellement relier la couleur du bois et sa texture à la présence de chaque agent fongique. Une dizaine de fragments de bois sous forme de bûchettes (10 x 5 x 5 mm) ont été découpées à la limite du bois sain dans chaque zone des nécroses observées. Il convient de noter qu'un cep peut comporter plusieurs types de nécroses et qu'un isolement a été réalisé pour chaque type de nécrose.

3.1.1. Désinfection des bûchettes et isolement

La désinfection ainsi que l'isolement ont été réalisés, en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire selon la technique décrite par Péros et Berger (1994) et Berraf et Péros (2005). Afin d'éliminer les contaminants de surface, les bûchettes ont été plongées dans un pilulier contenant une solution d'hypochlorite de sodium à 8° pendant 10 mn. Les bûchettes sont ensuite rincées par trois bains consécutifs à l'eau stérile et séchées sur du papier buvard stérile. Les coupes des bûchettes sont rafraîchies à l'aide d'un scalpel, puis sont disposées par cinq dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar, Difco, USA) (Annexe 2), scellées avec du parafilm et mises incubées à 25°C à l'obscurité.

L'observation des boîtes se fait tous les deux à trois jours et à chaque fois qu'une colonie se développe, celle-ci est repiquée sur le milieu PDA. Les bûchettes encore stériles, sont transférées dans d'autres boîtes de Pétri afin d'éviter qu'elles ne soient à leur tour envahies par le mycélium des autres bûchettes. Cette opération dure deux mois, temps nécessaire au développement de tous les champignons à croissance lente. Il est à noter qu'une bûchette peut laisser développer jusqu'à plus de trois champignons différents, alors que d'autres peuvent rester stériles.

3.1.2. Purification et conservation des isolats

De nombreux microorganismes sont isolés à partir des différentes nécroses observées, mais ne sont retenus que les champignons fréquemment isolés (Larignon, 1991 ; Péros *et al.*, 1997 et Luque *et al.*, 2009). D'après ces auteurs, ce sont ces agents fongiques qui sont incriminés dans les dépérissements. Dans le but de les identifier, nous avons procédé à leur purification par des repiquages successifs sur le milieu PDA, jusqu'à l'obtention de cultures pures. A partir de ces dernières; une dizaine de pastilles mycéliennes d'environ 5 mm de diamètre, sont mises dans des microtubes et conservées à une température de 4°C.

3.2. Méthodes d'identification des isolats

La méthodologie adoptée pour l'identification des différents agents fongiques est celle du laboratoire de microbiologie de l'université Nova de Lisboa (Portugal). La figure 11 récapitule l'ensemble des procédures de la caractérisation phénotypique et moléculaire des isolats de cette étude. Nous présentons les méthodes utilisées selon la chronologie des événements.

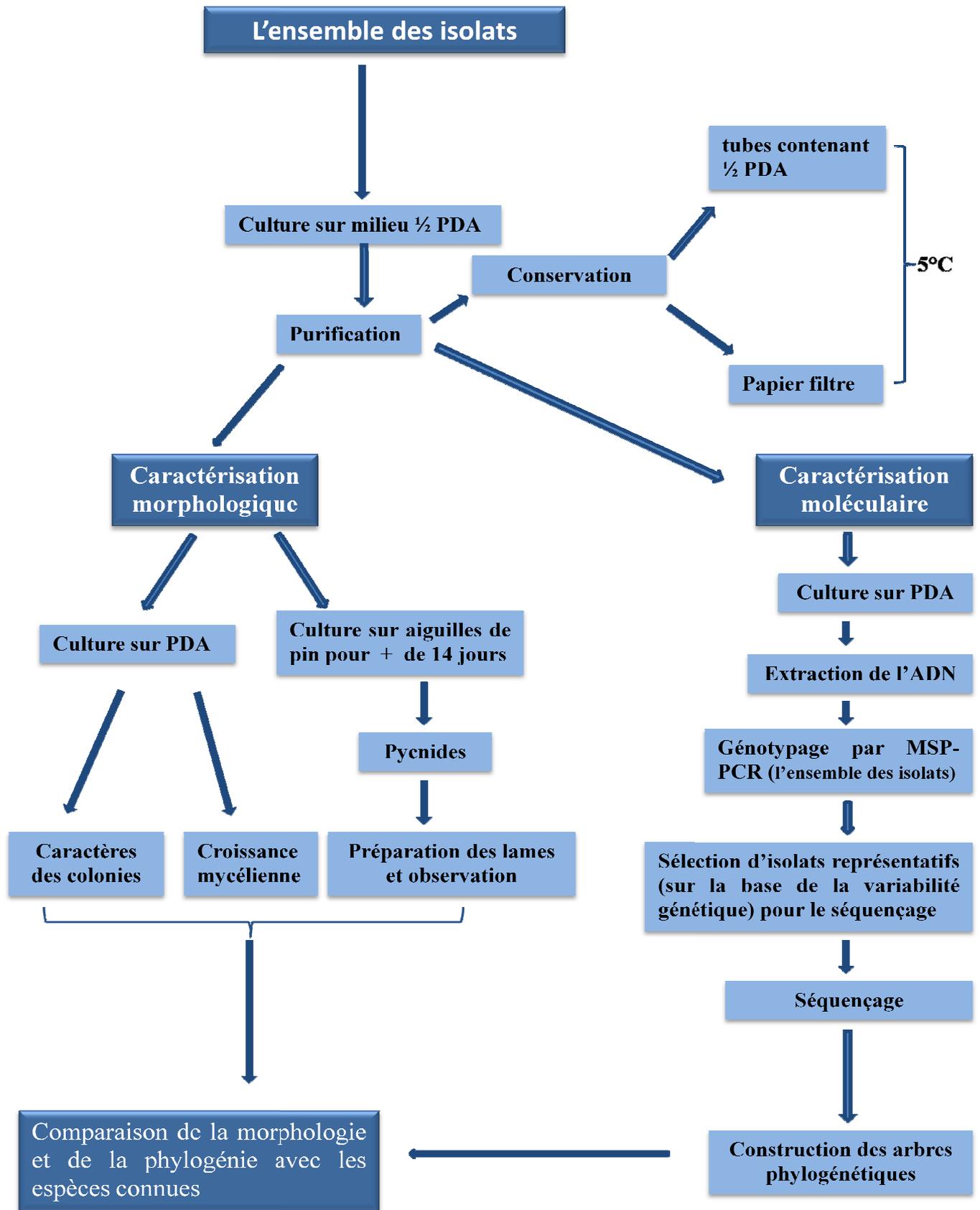


Fig. 11: Schémades étapes de la caractérisation morphologique et moléculaire des isolats

3.2.1. Matériel fongique

Les différents isolats conservés sont repiqués en prélevant de chaque microtube un disque mycélien. Ce dernier est transféré au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA. Afin de situer les isolats dans leur cadre taxonomique, ils sont identifiés de manière préliminaire, sur la base des descripteurs phénotypiques (tels que la couleur, la croissance du mycélium, aspect des fructifications, des phialides, des conidiophores) et comparés également aux isolats « types » ayant servi à la description des genres inféodés aux dépérissements (Tabl. 5). Aussi, les travaux de Berraf et Peros (2005) ont servi de base pour grouper les différents isolats en genres et famille.

Tableau 5 : Caractéristiques morphologiques des différents genres

Agents fongiques	Caractéristiques morphologiques	Références
<i>Phaeoconiella</i> spp.	Sur milieu PDA le mycélium a une croissance très lente ; lisse ressemblant à une culture bactérienne. Il devient vert olivâtre, avec l'âge et se caractérise par des chlamydozoospores bien développés, caractéristique du genre.	Crous et Gams (2000)
<i>Botryosphaeriaceae</i>	se caractérisent par un mycélium aérien à croissance rapide, d'une couleur blanche qui devient gris à vert foncé sur PDA. Les cultures peuvent montrer des pycnides solitaires ou groupées, de couleur noire. Différents types de conidies sont observées. Elles peuvent être hyalines ou pigmentées et cloisonnées ou aseptées permettant de différencier entre les genres.	Phillips et al. (2005 et 2007), Urbez-Torres et al. (2006)
<i>Phaeoacremonium</i> spp.	se caractérisent par une croissance très lente sur milieu PDA, un mycélium brun, ramifié, cloisonné, présentant des conidiophores. Présence de trois types de phialides selon la longueur. Les conidies sont hyalines, ellipsoïdales et agrégées en masses.	Mostert et al. (2006)
<i>Eutypa</i> spp.	se caractérisent par un mycélium blanc cotonneux à croissance rapide sur PDA. Il développe des pycnides noires globuleuses qui émettent des cirrhes jaunâtres contenant une multitude de conidies filiformes, arquées et hyalines.	Carter (1957), Trouillas et al. (2011)
<i>Fomitiporia</i> spp.	se caractérisent par un mycélium à croissance rapide. La culture sur PDA est blanche au début, devient très rapidement jaune à ocre et présente un aspect velouté.	Fischer (2002), Amalfi et al. (2010)

3.3. Identification moléculaire des isolats

3.3.1. Matériel génomique

L'ADN de l'ensemble de la collection est extrait à partir de mycélium en phase de croissance, âgé d'environ une semaine à un mois, selon les cultures. Le prélèvement du mycélium est réalisé par grattage à la surface de la gélose à l'aide d'un scalpel, sous une hotte stérile à flux laminaire.

3.3.1.1.Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été réalisée selon la méthode décrite par Santos et Phillips (2009). Elle consiste à mettre le mycélium collecté dans des tubes eppendorf de 2 ml contenant des micro-sphères en verre autoclavées (dans un volume équivalent à 50 μ l) et placés dans de l'azote liquide pendant 5 min. les eppendorf sont transférés dans de la glace afin de maintenir une basse température. 250 μ l de Phénol, 250 μ l de Chloroforme et 0,5 ml de tampon de lyse (Annexe 3) sont alors ajoutés. Vortexer 20 min puis Centrifuger pendant 25 min à 14500 rpm (rotations par minute) à 4°C.

La phase aqueuse (le surnageant) est transférée dans un eppendorf de 1,5 ml (soit environ 500 μ l) à laquelle nous ajoutons un volume égal d'isopropanol glacé (soit environ 500 μ l). Retourner doucement plusieurs fois puis Centrifuger pendant 10 min à 14500 rpm à 4°C. Le culot d'ADN est rincé avec 1 ml d'éthanol glacé à 70% après élimination du surnageant. L'ensemble est Centrifugé pendant 5 min à 14500 rpm à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot d'ADN est laissé sécher à une température ambiante. Après une évaporation complète de l'éthanol, l'ADN est resuspendu dans 50 μ l d'eau distillée, puis conservé à -20°C.

3.3.1.2. Evaluation quantitative et qualitative de l'ADN

La quantité d'ADN extraite a été évaluée par la mesure de la DO (densité optique) à 260 nm au spectrophotomètre du type NanoDrop ND-1000. Elle est déterminée selon la formule de Hoisington et *al.* (1994).

Une autre mesure de la DO a été prise à 280 nm, afin de déterminer la pureté de l'ADN. Ainsi le rapport entre la DO_{260} / DO_{280} constitue un moyen évaluatif numérique permettant d'apprécier la qualité de l'ADN extrait. Ce dernier est considéré pur lorsque le rapport est compris entre 1,8 et 2.

$$1,8 < DO_{260} / DO_{280} < 2$$

3.3.1.3. Amorces utilisées

Toutes les informations concernant les amorces utilisées pour la caractérisation moléculaire de cette étude sont présentées dans le tableau 6.

Tableau 6 : Amorces utilisées pour la caractérisation moléculaire des isolats

Région / Gène	Amorces	Séquence nucléotidique (5' - 3')	Taille des fragments	Référence
	M13	GAG GGT GGC GGT TCT		(Santos et Phillips, 2009)
	(GTG) ₅	GTG GTG GTG GTG GTG		(Santos et Phillips, 2009)
ITS (Internal-transcribed spacer)	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	600 pb	(White et <i>al.</i> , 1990)
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC		(White et <i>al.</i> , 1990)
Facteur d'élongation de traduction EF-1α	EF1-728F	CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG	300 pb	(Carbone et Kohn, 1999)
	EF1-986R	TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC		(Carbone et Kohn, 1999)
β-tubuline	T1	AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT	600 pb	(O'Donnell et Cigelnik, 1997)
	Bt2b	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC		(Glass et Donaldson, 1995)
Actine	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	300 pb	(Carbone et Kohn, 1999).
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT		

Egalement, toutes les réactions PCR ont été réalisées avec la Taq polymérase, des nucléotides et tampons fournis par MBI Fermentas (Vilnius, Lituanie), tandis que les amorces ont été fournies par la STAB Vida, Lda (Oeiras, Portugal), sauf les amorces M13 et (GTG)₅, qui ont été fournis par MWG Biotech AG (Ebersberg, Allemagne).

3.3.2. Génotypage par la technique MSP-PCR (Microsatellite-Primed PCR)

Le génotypage par MSP-PCR permet d'analyser la diversité génétique de l'ensemble de la collection, en vue d'une approche globale de caractérisation taxonomique. Contrairement à la phylogénie, la MSP-PCR ne vise pas à hiérarchiser une population ou à établir une relation de parenté entre ses membres, mais tente d'organiser ou partitionner cette population en sous-ensembles homogènes. Elle est estimée comme étant une méthode fiable et très utilisée pour l'étude de plusieurs individus en même temps et pour regrouper les nouveaux isolats dans le but de déterminer leur position taxonomique. Elle est moins lourde que le séquençage et peut donner des indications rapides sur le niveau de variabilité génétique au sein d'un taxon, d'une espèce ou d'une population donnée ; elle utilise des amorces simples (uniques) pour générer des empreintes génétiques. (Alves *et al.*, 2004 et 2007 ; Abdollahzadah *et al.*, 2009 et Santos et Phillips, 2009).

Les séquences M13 et (GTG)₅, sont testés comme amorce unique générant des empreintes génétiques qui seront observées sur gel d'électrophorèse. Ces empreintes sont soumises à une analyse typologique par la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) qui donne lieu à des dendrogrammes.

3.3.2.1. Protocole d'amplification par MSP-PCR

La réaction d'amplification a été effectuée dans un volume final de 25 µl constitué de 24 µl de la solution mix [10,25 µl de H₂O ultra-pure (Gibco), 2,5 µl de Tampon (Annexe 4), 3 µl de MgCl₂ (25 Mm), 4 µl d'amorce (5 µM), 4 µl de dNTP (1,25 mM), 0,5 µl de Taq polymérase (5 U/µl)] et 1 µl d'ADN (50-100 ng). Une fois le mélange réalisé, nous avons homogénéisé par agitation au vortex et centrifugé brièvement les tubes. Un témoin est aussi préparé contenant l'ensemble du mélange, sans l'ADN.

Les conditions d'amplification sont présentées dans le tableau 7 qui suit :

Tableau 7 : Conditions d'amplification de la MSP-PCR

Etapes	Températures	Durées	Nombre de cycles
Pré-dénaturation	94°C	2 minutes	40 cycles
Dénaturation	93°C	30 secondes	
Amplification	53°C	3 secondes	
Elongation	72°C	2 minutes	
Elongation finale	72°C	10 minutes	

La séparation des fragments de l'ADN amplifié s'est faite par migration des amplifiats sur un gel d'agarose (Gibco, BRL) à 1,5%, dans un tampon TBE (0,5 x) (45 mM Tris, 45 mM acide borique, 1mM EDTA, pH 8). Pour visualiser le front de migration, 2,5 µl de bleu de bromophénol-glycérol sont ajoutés à 5 µl de produit d'amplification et déposés dans chaque puit. Afin d'estimer la taille des fragments d'ADN, 3 µl de « Gene Ruler DNA ladder (MBI Fermentas) » a été déposé dans chaque puit situé à l'extrémité du gel. Un courant électrique de 80V entraîne la migration de l'ADN pendant 3 heures et 30 minutes. Le gel est immergé dans une solution contenant 250 ml d'eau distillée et 25 µl de Gel Red (Biotium, Hayward, California, USA) pendant 15 mn sous agitation. Le gel est ensuite rincé à l'eau pendant 30 mn. Des images du gel d'électrophorèse sont visualisées sous éclairage UV avec « Molecular Imager Gel Doc XR System » (Bio-Rad, Hercules, California, USA). La photographie de chaque gel est transférée vers le logiciel GELCOMPAR (version 4.1, Applied Maths, Belgium, 1998) pour le traitement. Dans ce programme, tous les modèles de similarité entre bandes ont été estimés par la corrélation de Pearson et regroupés dans un dendrogramme en utilisant la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) (Sneath *et al.*, 1973).

3.3.3. Séquençage

Les empreintes génétiques produites par les deux amorces microsatellites M13 et (GTG)₅ ont permis d'évaluer la diversité génétique au sein des isolats. Les bandes produites par les profils MSP-PCR de chaque genre, divise les isolats en groupes significatifs. Des isolats représentatifs de chaque groupe, y compris, lorsque cela est possible, les isolats provenant des symptômes d'eutypiose et de l'esca, ont été sélectionnés pour les analyses phylogénétiques et morphologiques. Le choix de la région à séquencer est fonction de chaque genre à identifier (Tabl. 5).

A cet égard, des amorces oligonucléotidiques ITS1 et ITS4, T1 et Bt2b, ACT 512F et ACT 783R, EF1-728F et EF1-986R ont été utilisées pour amplifier les gènes de l'ITS1-5.8S-ITS2, de la bêta-tubuline, de l'actine et du facteur d'elongation EF-1 α . Les réactions d'amplification ont été conduites dans un thermocycleur (Biometra-T Thermblock) selon les profils de températures décrits ci-dessous.

3.3.3.1. Amplification de la région ITS (Internal Transcribed Spacer)

L'amplification de la région ITS qui s'étend de la petite sous-unité (gène 18S) à la grande sous-unité (gène 28S) couvrant ainsi le gène 5.8S de l'ADNr et ses espaceurs flanquants ITS1 et ITS2, a été réalisée pour les isolats de la famille des *Botryosphaeriaceae*, des genres *Eutypa*, *Phaeomoniella* et *Fomitiporia*. En ce qui concerne le genre *Phaeoacremonium*, Groenewald et al, (2001) et Mostert et al, (2005) ont constaté que les ITS ne sont pas suffisamment informatifs pour distinguer de manière fiable les isolats au niveau espèce et donc cette région a été exclue de l'examen.

Des amorces oligonucléotidiques ITS1 et ITS4 (White et al., 1990) sont utilisées tel que décrit par Alves et al., (2004). L'amplification est réalisée dans un volume final de 50 μ l constitué de 49 μ l de la solution mix [25,3 μ l de H₂O ultra- pure (Gibco), 5 μ l de Tampon, 6 μ l de MgCl₂ (25 Mm), 1,5 μ l de chaque amorce (10 μ M), 8 μ l de dNTP (1,25 mM), 0,2 μ l de Taq polymérase (5 U/ μ l), 2,5 μ L de DMSO (Dimethyl sulfoxide) (1%) afin d'améliorer l'amplification de certains ADN] et 1 μ l d'ADN (50-100 ng). Des contrôles négatifs à l'eau stérile au lieu de l'ADN sont utilisés dans chaque réaction PCR. Les conditions d'amplification pour ces régions sont présentées dans le tableau 8 qui suit :

Tableau 8: Conditions d'amplification des ITS

Etapes	Températures	Durées	Nombre de cycles
Pré-dénaturation	95°C	5 secondes	40 cycles
Dénaturation	94°C	1 minute	
Amplification	52°C	30 secondes	
Elongation	72°C	1 minute	
Elongation finale	72°C	10 minutes	

Après amplification, 5 μ l de chaque produit de PCR sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose (Gibco, BRL) à 1%, dans un tampon TAE (1 x) (40 mM de Tris, 40 mM d'acetate, 1mM d'EDTA, pH 8) contenant Gel Red (2 μ l / 80 ml de gel) pendant 45 mn à 80 V.

La taille des fragments d'ADN générés est déterminée par comparaison avec la gamme de concentrations d'ADN standard du marqueur de taille moléculaire (GeneRuler - DNA Ladder) déposé à raison de 6µl par puit sur les deux côtés de chaque gel. Les bandes amplifiées sont visualisées sous éclairage UV avec « Molecular Imager Gel Doc XR System » (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

3.3.3.2. Amplification du gène du facteur d'élongation de traduction (EF1- α)

L'amplification du gène du facteur d'élongation de traduction (EF1- α) a été réalisée uniquement pour les isolats de la famille des *Botryosphaeriaceae*. Les amorces EF1-728F et EF1-986R (Carbone et Kohn, 1999) sont utilisées tel que décrit par Phillips et *al.*, (2005). Le mélange réactionnel confectionné pour cette amplification est identique à celui décrit pour l'amplification de la région ITS. Les conditions d'amplification sont présentées dans le tableau 9 ci-dessous:

Tableau 9 : Conditions d'amplification du facteur EF1- α

Etapes	Températures	Durées	Nombre de cycles
Pré-dénaturation	95°C	7 minutes	40 cycles
Dénaturation	94°C	1 minute	
Amplification	50°C	1 minute	
Elongation	72°C	1 minute	
Elongation finale	72°C	10 minutes	

Toutes les étapes ultérieures, comme l'électrophorèse et les conditions de détermination de la taille des fragments de l'ADN générés, sont similaires à ceux décrits précédemment pour la région ITS.

3.3.3.3. Amplification du gène de la β -tubuline

La région de la β -tubuline a été amplifiée pour les isolats de *Phaeoacremonium*. Un fragment d'environ 600 bp du gène de la β -tubuline (TUB) a été amplifié en utilisant les amorces T1 (O'Donnell et Cigelnik, 1997) et Bt2b (Glass et Donaldson, 1995); le mélange réactionnel confectionné pour l'amplification PCR est celui décrit pour l'amplification des ITS et de l'EF1- α . Toutes les étapes ultérieures, comme l'électrophorèse et les conditions de détermination de la taille des fragments de l'ADN, sont similaires à ceux décrits

précédemment pour la région ITS. Les conditions d'amplification sont présentées dans le tableau 10 ci-dessous:

Tableau 10: Conditions d'amplification du gène de la β -tubuline

Etapes	Températures	Durées	Nombre de cycles
Pré-dénaturation	94°C	5 minutes	40 cycles
Dénaturation	94°C	30 secondes	
Amplification	52°C	3 secondes	
Elongation	72°C	1 minute	
Elongation finale	72°C	10 minutes	

3.3.3.4. Amplification du gène de l'actine

Cette région a été également amplifiée pour les isolats de *Phaeoacremonium*. Un fragment d'environ 300 pb du gène de l'actine (ACT) a été amplifié selon les conditions décrites par Mostert et *al.* (2006b) en utilisant les amorces ACT 512F et ACT 783R (Carbone et Kohn, 1999).

Tableau 11: Conditions d'amplification du gène de l'actine

Etapes	Températures	Durées	Nombre de cycles
Pré-dénaturation	96°C	5 minutes	35 cycles
Dénaturation	95°C	30 secondes	
Amplification	57°C	30 secondes	
Elongation	72°C	3 secondes	
Elongation finale	72°C	7 minutes	

3.3.3.5. Purification de l'ADN et séquençage

Les séquences nucléotidiques amplifiées par PCR sont purifiées en utilisant le kit commercial Spin® Nucleo Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Germany), selon les instructions du fabricant. Les deux brins de l'ensemble des produits de PCR (la région ITS, les gènes de l'EF1- α , de la β -tubuline et de l'actine) ont été séquencés par la société STAB Vida, Lda (Oeiras, Portugal).

3.3.4. Analyses phylogénétiques

3.3.4.1. Traitement des séquences

Les séquences complètes de la région ITS et les fragments des gènes EF1- α , β -tubuline et actine sont lus et édités. Une séquence consensus est faite à partir des séquences sens « forward » et anti-sens « reverse » en utilisant l'éditeur d'alignement de séquences BioEdit Version 7.0.9.0 (Hall, 1999). A l'aide des chromatogrammes fournis, toutes les séquences ont été vérifiées manuellement et des arrangements de nucléotides à des positions ambiguës ont été clarifiés.

Des séquences de référence déposées dans la banque publique GenBank (NCBI) ayant le plus de similarité aux espèces obtenues dans cette étude ont été trouvées par un alignement utilisant l'algorithme BLASTn (Basic local alignment search tool) (Altschul *et al.* 1990). Aussi, des séquences de références représentant les espèces les plus pertinentes pour les *Botryosphaeriaceae* (Crous *et al.*, 2006; Damm *et al.*, 2007; Phillips *et al.*, 2008), *Phaeoacremonium* (Gramaje *et al.*, 2009; Mostert *et al.*, 2006.), *Phaeoconiella* (Crous *et al.*, 2008), *Eutypa* (Trouillas *et al.*, 2011) et *Fomitiporia* (Amalfi *et al.*, 2010) ont été ajoutées à l'analyse. A cet égard, il sera possible de positionner les espèces nouvellement découvertes parmi celles déjà décrites. Les différentes séquences nucléotidiques des quatre régions de l'ADN sont listées dans les tableaux 12, 13, 14, 15, 16, 17.

3.3.4.2. Alignement des séquences

Le logiciel ClustalX 1.83(Thompson *et al.*, 1997) a été utilisé pour aligner les séquences à analyser phylogénétiquement. Le principe de cet alignement repose sur la maximisation d'appariements sites à sites (c'est-à-dire de faire correspondre deux bases identiques à une position donnée), en minimisant les mésappariements (association de deux bases différentes à un même site). En complément de l'alignement logiciel, des modifications manuelles ont été réalisées lorsque cela était nécessaire. Il a été montré que la qualité de l'alignement pouvait avoir un impact sur l'arbre final aussi important, voire plus, que la méthode de construction employée (WuetEisen, 2008). La préparation d'alignements de qualité est donc une étape cruciale de toute analyse phylogénétique. Les séquences une fois alignées, constituent une matrice de caractères, où chaque ligne est une espèce et chaque colonne un caractère (une position dans la séquence). Sur cette matrice, les procédures de construction d'arbres vont être appliquées aux différents genres.

Tableau 12: Numéros d'accèsion à GenBank et données des espèces de *Phaeoacremonium* utilisées pour la reconstruction des arbres phylogénétiques

Espèce	Numéro d'isolat	Origine	Plante hôte	Collecteur	Numéro d'accèsion à GenBank	
					TUB	ACT
<i>Phaeoacremonium. aleophilum</i> (<i>Togninia minima</i>)	STE-U 5836	South Africa	<i>Prunus salicina</i>	unknown	EU128065	EU128107
	CBS 100397	Italy	<i>Vitis vinifera</i>	S. Serra	AF246806	AY735498
	CBS 110703	South Africa	<i>V. vinifera</i>	L. Mostert	DQ173094	DQ173115
<i>Pm. alvesii</i>	STE U 6089	South Africa	<i>Prunus salicina</i>	unkn51own	EU128063	EU128105
	CBS 110034	Brasil	Human	S.H. Alves	AY579301	AY579234
<i>Pm. amstelodamense</i>	CBS 110627	Netherlands	Human	J. Bruins	AY579295	AY579228
<i>Pm. angustius</i>	CBS 114992	U.S.A	<i>V. vinifera</i>	P. Larignon	DQ173104	DQ173127
<i>Pm. australiense</i>	CBS 113589	Australia	<i>V. vinifera</i>	T. Knaggs	AY579296	AY579229
	STE-U 5960	South Africa	<i>P. salicina</i>	unknown	EU128069	EU128111
<i>Pm. cinereum</i>	STE-U 5961	South Africa	<i>P. salicina</i>	unknown	EU128070	EU128112
	CBS 123909	Spain	<i>V. vinifera</i>	H. Mohammadi	FJ517157	FJ517149
<i>Pm. croatiense</i>	CBS 123037	Croatia	<i>V. vinifera</i>	B. Cvjetkovic	EU863482	EU863514
<i>Pm. fuscum</i>	STE-U 5969	South Africa	<i>P. salicina</i>	U. Damm	EU128098	EU128141
	STE-U 6366	South Africa	<i>P. salicina</i>	U. Damm	EU128199	EU128140
<i>Pm. griseorubrum</i>	STE-U 5957	South Africa	<i>P. salicina</i>	unknown	EU128074	EU128116
	STE-U 5958	South Africa	<i>P. salicina</i>	unknown	EU128075	EU128117
	CBS 111657	U.S.A	Human	D. Sutton	AY579294	AY579227
<i>Pm. hispanicum</i>	CBS 123910	Spain	<i>V. vinifera</i>	D. Gramaje	FJ517164	FJ517156
<i>Pm. hungaricum</i>	CBS 123036	Hungary	<i>V. vinifera</i>	B.T. Dula	EU863483	EU863515
<i>Pm. inflatipes</i>	CBS 166.75	Costa Rica	<i>Nectandra sp.</i>	I.A.S. Gibson	AY579322	AY579258
	CBS 113273	U.S.A	<i>Hypoxylon truncatum</i>	B. Horn	AY579323	AY579260
<i>Pm. iranianum</i>	STE-U 6091	South Africa	<i>Prunus armeniaca</i>	unknown	EU128078	EU128120
	CBS 101357	Italy	<i>Actinidia chinensis</i>	F. Cazarano & S.Di Marco	DQ173096	DQ173120
<i>Pm. krajdenii</i>	CBS 109479	Canada	Human	S. Krajden	AY579330	AY579267
<i>Pm. pallidum</i>	STE-U 6104	South Africa	<i>P. armeniaca</i>	U. Damm	EU128103	EU128144

CHAPITRE II : METHODOLOGIE

<i>Pm. parasiticum (Togninia parasitica)</i>	CBS 860.73	U.S.A	Human	R. T. Steigbigel	AF246803	AY579253
	STE-U 6093	South Africa	<i>P. armeniaca</i>	unknown	EU128081	EU128123
<i>Pm. prunicolum</i>	STE-U 5967	South Africa	<i>P. salicina</i>	U. Damm	EU128095	EU128124
	STE-U 5968	South Africa	<i>P. salicina</i>	U. Damm	EU128096	EU128138
<i>Pm. Rubrigenum (T. rubrigena)</i>	CBS 498.94	U.S.A	Human	K.J. Kwon-Chung	AF246802	AY579238
<i>Pm. scolyti</i>	STE-U 6096	South Africa	<i>P. armeniaca</i>	unknown	EU128084	EU128126
	STE-U 6099	South Africa	<i>Prunus persica</i>	unknown	EU128087	EU128129
	STE-U 5954	South Africa	<i>P. salicina</i>	unknown	EU128090	EU128132
<i>Pm. sphinctrophorum</i>	CBS 337.90	Laos U.S.A	Human	S. Krajden & R.C. Summerbell	DQ173113	DQ173142
<i>Pm. subulatum</i>	STE-U 6094	South Africa	<i>Prunus armeniaca</i>	unknown	EU128092	EU128134
	CBS 113584	South Africa	<i>V. vinifera</i>	L. Mostert	AY579298	AY579231
<i>Pm. tardicrescens</i>	CBS 110573	U.S.A	Human	Levi	AY579300	AY579233
<i>Pm. theobromatis</i>	CBS 111586	Ecuador	<i>Theobroma gileri</i>	H.C. Evans	DQ173106	DQ173132
<i>Pm. tuscanum</i>	CBS 123033	Italy	<i>V. vinifera</i>	L. Mugnai	EU863458	EU863490
<i>Pm. venezuelense</i>	CBS 651.85	Venezuela	Human	M.B. De Albornoz	AY579320	AY579256
	CBS 110119	South Africa	<i>V. vinifera</i>	L. Mostert	AY579318	AY579251
<i>Pm. vibratilis</i>	CBS 117115	Unknown	Unknown	Unknown	DQ649063	DQ649064
<i>Pm. viticola</i>	CBS 428.95	Germany	<i>Sorbus intermedia</i>	K. Weise	DQ173107	DQ173133
	CBS 113065	South Africa	<i>V. vinifera</i>	L. Mostert	DQ173105	DQ173128
<i>T. africana</i>	STE-U 6177	South Africa	<i>P. armeniaca</i>	U. Damm	EU128100	EU128142
	STE-U 6364	South Africa	<i>P. armeniaca</i>	U. Damm	EU128101	EU128143
<i>T. austroafricana</i>	CBS 112949	South Africa	<i>V. vinifera</i>	L. Mostert	DQ173099	DQ173122
<i>T. fraxinopennsylvanica (Pm. mortoniae)</i>	STE-U 6101	South Africa	<i>P. salicina</i>	unknown	EU128079	EU128121
	STE-U 6102	South Africa	<i>P. salicina</i>	unknown	EU128080	EU128122
<i>T. griseo-olivacea</i>	STE-U 5966	South Africa	<i>P. armeniaca</i>	U. Damm	EU128097	EU128139

CBS: Culture collection of the Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Diversity Centre, Utrecht, The Netherlands.

STE-U: Culture collection of the Department of Plant Pathology, University of Stellenbosch, South Africa.

CHAPITRE II : METHODOLOGIE

Tableau 13: Numéros d'accèsion à GenBank et données des espèces de *Diplodia* et *Lasiodiplodia* utilisées pour la reconstruction des arbres phylogénétiques

Espèces	Numéro d'isolat	Origine	Plante hôte	Collecteur	Numéros d'accèsion à GenBank	
					ITS	EF1- α
<i>Diplodia mutila</i>	CBS 112553	Portugal	<i>Vitis vinifera</i>	A.J.L. Phillips	AY259093	
<i>Diplodia mutila</i>	CBS 230.30	U.S.A	<i>Phoenix dactylifera</i>	L.L. Huillier	DQ458886	DQ458869
<i>D. corticola</i>	CBS 112547	Spain	<i>Quercus ilex</i>	M.E. Sanchez	AY259110	DQ458872
<i>D. corticola</i>	CBS 112549	Portugal	<i>Quercus suber</i>	A. Alves	AY259100	AY573227
<i>D. seriata</i>	CBS 112555	Portugal	<i>Vitis vinifera</i>	A.J.L. Phillips	AY259094	AY573220
<i>D. seriata</i>	CBS 119049	Italy	<i>Vitis</i> sp.	L. Mugnai	DQ458889	DQ458874
<i>D. seriata</i>	CAP 220	Italy	<i>Olea europaea</i>	S. Frisullo	EU392294	EU392271
<i>D. pinea</i>	CBS 393.84	Netherlands	<i>Pinus nigra</i>	H.A. van der Aa	DQ458895	DQ458880
<i>D. pinea</i>	CBS 109943	Indonesia	<i>Pinus patula</i>	M.J. Wingfield	DQ458898	DQ458883
<i>D. scrobiculata</i>	CBS 109944	Mexico	<i>Pinus greggii</i>	M.J. Wingfield	DQ458899	DQ458884
<i>D. scrobiculata</i>	CBS 113423	Mexico	<i>Pinus greggii</i>	M.J. Wingfield	DQ458900	DQ458885
<i>D. cupressi</i>	CBS 168.87	Israel	<i>Cupressus sempervirens</i>	Z. Solel	DQ458893	DQ458879
<i>D. cupressi</i>	CBS 261.85	Israel	<i>Cupressus sempervirens</i>	Z. Solel	DQ458894	DQ458879
<i>Diplodia alatafructa</i>	CBS124931	S. Africa	<i>Pterocarpus angolensis</i>	J Mehl & J Roux	FJ888460	FJ888444
<i>Diplodia alatafructa</i>	CBS124932	S. Africa	<i>Pterocarpus angolensis</i>	J Mehl & J Roux	FJ888461	FJ888445
<i>Diplodia malorum</i>	CBS112554	Portugal	<i>Malus sylvestris</i>	A.J.L. Phillips		
<i>Diplodia malorum</i>	CAP 266	Portugal	<i>Malus sylvestris</i>	A.J.L. Phillips	GQ923860	GQ923828
<i>Diplodia malorum</i>	CAP 265	Portugal	<i>Malus sylvestris</i>	A.J.L. Phillips	GQ923859	GQ923827
<i>Diplodia rosulata</i>	CBS116470	Ethiopia	<i>Prunus africana</i>	A Gure	EU430265	EU430267
<i>Diplodia rosulata</i>	CBS116472	Ethiopia	<i>Prunus africana</i>	A Gure	EU430266	EU430268
<i>Diplodia africana</i>	CBS120835	S. Africa	<i>Prunus persica</i>	U Damm	EF445343	EF445382
<i>Diplodia africana</i>	CBS121104	S. Africa	<i>Prunus persica</i>	U Damm	EF445344	EF445383
<i>Diplodia olivarum</i>	CAP235	Italy	<i>Olea europaea</i>	S.Frisullo	EU392301	EU392278
<i>Diplodia olivarum</i>	CAP 257	Italy	<i>Olea europaea</i>	S.Frisullo		
<i>Diplodia bulgarica</i>	CAP 331	Bulgaria	<i>Malus sylvestris</i>	S. Bobev		
<i>Diplodia bulgarica</i>	CAP 332	Bulgaria	<i>Malus sylvestris</i>	S. Bobev		
<i>Diplodia tsugae</i>	CBS 418.64	Canada	<i>Tsuga heterophylla</i>	A. Funk	DQ458888	DQ458873
<i>Lasiodiplodia citricola</i>	IRAN 1521C	Iran	<i>Citrus</i> sp.	A. Shekari	GU945353	GU945339

CHAPITRE II : METHODOLOGIE

<i>Lasiodiplodia citricola</i>	IRAN 1522C	Iran	<i>Citrus</i> sp.	J.Abdollahzadeh/A. Javadi	GU945354	GU945340
<i>L. gilanensis</i>	IRAN 1501C	Iran	Unknown	J Abdollahzadeh/A. Javadi	GU945352	GU945341
<i>L. gilanensis</i>	IRAN 1523C	Iran	Unknown	J. Abdollahzadeh/A. Javadi	GU945351	GU945342
<i>L. hormozganensis</i>	IRAN 1498C	Iran	<i>Mangifera indica</i>	J.Abdollahzadeh/A. Javadi	GU945356	GU945344
<i>L. hormozganensis</i>	IRAN 1500C	Iran	<i>Olea</i> sp.	J.Abdollahzadeh/A. Javadi	GU945355	GU945343
<i>L. plurivora</i>	CBS 121103	South Africa	<i>Vitis vinifera</i>	F. Halleen	AY343482	EF445396
<i>L. plurivora</i>	CBS 120832	South Africa	<i>Prunus salicina</i>	U. Damm	EF445362	EF622063
<i>L. iraniensis</i>	IRAN 921C	Iran	<i>Mangifera indica</i>	N. Khezrinejad	GU945346	GU945334
<i>L. iraniensis</i>	IRAN 1502C	Iran	<i>Juglans</i> sp.	A. Javadi	GU945347	GU945335
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS 374.54	Zaire	<i>Coffea</i> sp.	Unknown	EF622080	EF622059
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS447 62	Unknown	<i>Citrus aurantium</i>	Unknown	EF622081	EF622060
<i>L. venezuelensis</i>	WAC 12539	Venezuela	<i>A. mangium</i>	S. Mohali	DQ103547	DQ103568
<i>L. venezuelensis</i>	WAC 12540	Venezuela	<i>A. mangium</i>	S. Mohali	DQ103548	DQ103569
<i>L. missouriana</i>	UCD2193MO	USA	Catawba	K. Striegler & G.M. Leavitt	HQ288225	HQ288267
<i>L. missouriana</i>	UCD2199MO	USA	Catawba	K. Striegler & G.M. Leavitt	HQ288226	HQ288268
<i>L. viticola</i>	UCD2553AR	USA	Vignoles	R.D. Cartwright & W.D. Gubler	HQ288227	HQ288269
<i>L. viticola</i>	UCD2604MO	USA	Chardonel	K. Striegler & W.D. Gubler	HQ288228	HQ288270
<i>L. gonubiensis</i>	CBS 115812	South Africa	<i>Syzygium cordatum</i>	D. Pavlic	DQ458892	DQ458877
<i>L. gonubiensis</i>	CBS 116355	South Africa	<i>Syzygium cordatum</i>	D. Pavlic54	AY639594	DQ103567
<i>L. parva</i>	CBS 494.78	Colombia	Cassava-field soil	O. Rangel	EF622084	EF622064
<i>L. theobromae</i>	CBS 289.56	New Guinea	<i>Sail-Cloth</i>	M.B. Schwartz	EF622070	EF622050
<i>L. theobromae</i>	CBS 112874	South Africa	<i>Vitis vinifera</i>	F. Halleen	EF622075	EF622055
<i>L. crassispora</i>	CMW 13488	Venezuela	<i>Eucalyptus urophylla</i>	S. Mohali	DQ103552	DQ103559
<i>L. rubroporpurea</i>	WAC12535	Australia	<i>Eucalyptus grandis</i>	T.I. Burguess & G. Pegg	DQ103553	DQ103571
<i>L. rubroporpurea</i>	WAC12536	Australia	<i>Eucalyptus grandis</i>	T.I. Burguess & G. Pegg	DQ103554	DQ103572
<i>Diplodia intermedia</i>	CAP 150	Portugal	<i>Cydonia</i> sp.	S. Santos	HM036528	
<i>Diplodia intermedia</i>	CAP 330	Bulgaria	<i>Pyracantha coccinea</i>	S. Bobev	GQ923881	GQ923849
<i>Diplodia intermedia</i>	CBS112556	Portugal	<i>Pyrus communis</i>	A.J.L. Phillips		GQ923850

CHAPITRE II : METHODOLOGIE

Tableau 14: Numéros d'accèsion à GenBank et données des espèces de *Fusicoccum* et *Neofusicoccum* utilisées pour la reconstruction des arbres phylogénétiques

Espèce	Numéro d'isolat	Origine	Plante hôte	Collecteur	Numéro d'accèsion à GenBank	
					ITS	TEF
<i>Neofusicoccum parvum</i>	CBS 110301	Portugal	<i>Vitis vinifera</i>	A.J.L. Phillips	AY259098	AY573221
	CAP247	Portugal	<i>Vitis vinifera</i>	A.J.L. Phillips	EF638786	EF638745
	CMW 994	New Zealand	<i>Malus sylvestris</i>	G.J. Samuels	AF243395	AY236883
<i>Neofusicoccum kwambonambiense</i>	CBS 123643	South Africa	<i>S. cordatum</i>	D. Pavlic	EU821894	EU821954
	CBS 123639	South Africa	<i>S. cordatum</i>	D. Pavlic	EU821900	EU821870
<i>N. australe</i>	CBS 119046	Portugal	<i>Rubus sp.</i>	E. Diogo	DQ299244	EU017541
	CAP 252	Italy	<i>Olive</i>	Unknown	EF638777	EF638740
	CAP 221	Italy	<i>Olive</i>	Unknown	EF638773	EF638736
	CMW 9072	Australia	<i>Acacia sp.</i>	J. Roux	AY339260	AY392687
<i>N. lutea</i>	CBS 110299	Portugal	<i>Vitis vinifera</i>	Unknown	AY259091	AY573217
	CMW 9076	New Zeland	<i>Malus domestica</i>	S.R. Pennycook	AY339257	AY339265
<i>N. mediterraneum</i>	CAP 253	Italy	<i>Olive</i>	Unknown	EF638787	EF638746
	CAA 002	USA	<i>Pistacia vera</i>	T.J. Michailides	EU017537	EU017538
<i>Neofusicoccum vitifusiforme</i>	CBS 110887	South Africa	<i>Vitis vinifera</i>	J. Van Niekerk	AY343383	AY343343
	CBS 110880	South Africa	<i>Vitis vinifera</i>	J. Van Niekerk	AY343382	AY343344
<i>B. dothidea</i>	CBS 110302	Portugal	<i>Vitis vinifera</i>	A.J.L. Phillips	AY259092	AY573218
	CBS 115476	Switzerland	<i>Prunus sp.</i>	B. Slippers	AY236949	AY236898
	CAP288	Portugal	<i>Vitis vinifera</i>	A.J.L. Phillips	EF638755	EF638732
	CAP246	Portugal	<i>Vitis vinifera</i>	A.J.L. Phillips	EF638766	EF638730
<i>Neofusicoccum umdonicola</i>	CBS 123645	South Africa	<i>cordatum Kosi Bay</i>	D. Pavlic	EU821904	EU821874
	CBS 123648	South Africa	<i>cordatum Kosi Bay</i>	D. Pavlic	EU821926	EU821896
<i>Fusicoccum fabicercianum</i>	CBS 127194	China	<i>Eucalyptus sp.</i>	M.J. Wingfield	HQ332198	HQ332214
	CBS 127193	China	<i>Eucalyptus sp.</i>	M.J. Wingfield	HQ332197	HQ332213
<i>Botryosphaeria corticis</i>	CBS 119047	USA	<i>Vaccinium corymbosum</i>	P.V. Oudemans	DQ299245	EU017539
<i>Fusicoccum ramosum</i>	CBS 122069	Australia	<i>E. camaldulensis</i>	T. Burgess	EU144055	EU144070
<i>Fusicoccum atrovirens</i>	CBS 124934	South Africa	<i>Pterocarpus angolensis</i>	J. Mehl & J. Roux	FJ888473	FJ888456
	CBS 124935	South Africa	<i>Pterocarpus angolensis</i>	J. Mehl & J. Roux	FJ888476	FJ888457

CHAPITRE II : METHODOLOGIE

<i>Botryosphaeria mamane</i>	CBS 117445	Venezuela	<i>Acacia mangium</i>	S. Mohali	EF118046	GU134939
	CBS 117446	Venezuela	<i>Acacia mangium</i>	S. Mohali	EF118048	GU134940
<i>Neofusicoccum mangiferum</i>	CBS 118531	Australia	<i>Mangifera indica</i>	G.I. Johnson	AY615185	DQ093221
<i>Neofusicoccum cordaticola</i>	CBS 123637	South Africa	<i>S. cordatum Sabi</i>	D. Pavlic	EU821922	EU821982
	CMW14056	South Africa	<i>S. cordatum Sabi</i>	D. Pavlic	EU821903	EU821873
<i>Neofusicoccum ribis</i>	CMW 7772	USA	<i>Ribes sp.</i>	B. Slippers & G. Hudler	AY236935	AY236877
	CMW 7773	USA	<i>Ribes sp.</i>	B. Slippers & G. Hudler	AY236936	AY236878

Tableau 15: Numéros d’accession à GenBank et données des espèces de *Phaeomoniella* utilisées pour la reconstruction des arbres phylogénétiques

Espèce	Numéro d’isolat	Origine	Plante hôte	Collecteur	Noméro d’accession à GenBank	
					ITS	
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	CBS 229.95	Italy	<i>Vitis vinifera</i>	Unknown	AF197973	
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	CBS 161 90	South Africa	<i>Vitis vinifera</i>	Unknown	AF266652	
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	AL12	France	<i>Vitis vinifera</i>	Unknown	FJ530943	
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	AQ04	France	<i>Vitis vinifera</i>	Unknown	FJ530942	
<i>Phaeomoniella dura</i>	CBS 120882	South Africa	<i>P. salicina</i>	U. Damm	GQ154597	
<i>Phaeomoniella prunicola</i>	CBS 120876	South Africa	<i>P. salicina</i>	U. Damm	GQ154590	
<i>Phaeomoniella prunicola</i>	STE-U 6117	South Africa	<i>P. salicina</i>	U. Damm	GQ154596	
<i>Phaeomoniella tardicola</i>	CBS 121757	South Africa	<i>P. salicina</i>	U. Damm	GQ154599	
<i>Phaeomoniella zymoides</i>	CBS 121168	South Africa	<i>P. salicina</i>	U. Damm	GQ154600	
<i>Phaeomoniella zymoides</i>	SFC AW304	Korea	<i>Pi. densiflora</i>	Unknown	DQ270242	
<i>Phaeomoniella zymoides</i>	SFC DY07	Korea	<i>Pi. densiflora</i>	Unknown	DQ270245	
<i>Phaeomoniella effusa</i>	CBS 120883	South Africa	<i>P. salicina</i>	U. Damm	GQ154598	
<i>Phaeomoniella capensis</i>	CBS 123535	Unknown	<i>Living leaves of E. altensteinii</i>	Unknown	FJ372391	
<i>Phaeomoniella piniflorum</i>	SFC CW202	Korea	<i>Pinus densiflora</i>	Unknown	DQ270240	

STE-U: Culture collection of the Department of Plant Pathology, University of Stellenbosch, South Africa.

SFC: Seoul National University Fungus Collection, Seoul National University, Seoul, Korea. CMW: Tree Protection Co-operative Program, Forestry and Agricultural Biotechnology Institute, University of Pretoria. CAA – A. Alves, Universidade de Aveiro, Portugal; CBS – Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands; CMW – M.J. Wingfield, FABI, University of Pretoria, South Africa; STE-U– Department of Plant Pathology, University of Stellenbosch, South Africa.

Tableau 16: Numéros d'accèsion à GenBank et données des espèces d'*Eutypa* utilisées pour la reconstruction des arbres phylogénétiques

Espèces	Numéro d'isolat	Origine	Plante hôte	Collecteur	Numéros d'accèsion à GenBank
					ITS
<i>Eutypa lata</i>	CBS 208.87	Switzerland	<i>Tilia sp.</i>	Unknown	DQ006927
<i>Eutypa lata</i>	EA1	Australia	<i>Vitis vinifera</i>	Maurice Carter	DQ006937
<i>Eutypa lata</i>	E456	California	<i>Prunus armeniaca</i>	Unknown	DQ006932
<i>Eutypa petrakii var. petrakii</i>	CBS 244.87	Switzerland	<i>Prunus spinosa</i>	Unknown	AJ302455
<i>Eutypa petrakii var. petrakii</i>	CBS 245.87	Normay	<i>Salix borealis</i>	Unknown	AJ302456
<i>Eutypa laevata</i>	CBS 291.87	Switzerland	<i>Salix sp.</i>	Unknown	AJ302449
<i>Eutypa astroidea</i>	CBS 292.87	Switzerland	<i>Fraxinus excelsior</i>	Unknown	AJ302458
<i>Eutypa crustata</i>	CBS 210.87	France	<i>Ulmus sp.</i>	Unknown	AJ302448
<i>Eutypa lejiplaca</i>	CBS 248.87	Switzerland	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Unknown	DQ006922
<i>Eutypa lejiplaca</i>	020202-5	Switzerland	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Rappaz	AY684221
<i>Eutypa maura</i>	CBS219.87	Switzerland	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Unknown	DQ006926
<i>Eutypa maura</i>	020202-8	Switzerland	<i>Acer sp.</i>	Rappaz	AY684222
<i>Eutypa tetragona</i>	CBS 284.87	France	<i>Sarothamnus scoparius</i>	Unknown	DQ006923
<i>Eutypa sparsa</i>	3802-3a	Switzerland	<i>Populus sp.</i>	Rappaz	AY684219
<i>Eutypa sparsa</i>	3802-3b	Switzerland	<i>Populus sp.</i>	Rappaz	AY684220
<i>Eutypa leptoplaca</i>	CBS 287.87	Switzerland	<i>Frangula alnus</i>	Rappaz	AY684226
<i>Eutypa leptoplaca</i>	D-Hb-800	USA	<i>Vitis vinifera</i>	Trouillas	AY684231
<i>Eutypa lata var. aceri</i>	CBS 217.87	France	<i>Acer campestre</i>	Unknown	AJ302451
<i>Eutypa lata var. aceri</i>	CBS 290.87	Switzerland	<i>Acer pseudoplatanus</i>	Unknown	DQ006925

CHAPITRE II : METHODOLOGIE

Tableau 17: Numéros d'accèsion à GenBank et données des espèces de *Fomitiporia* utilisées pour la reconstruction des arbres phylogénétiques

Espèce	Numéro d'isolat	Origine	Collecteur	Numéro d'accèsion à GenBank
				ITS
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	MUCL 38514	Italy	M. Fischer	GU461953
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	MUCL 45670	France	M. Fischer	GU461980
<i>Fomitiporia erecta</i>	MUCL 49871	Fiasson	A. David, Dequate & Fiasson	GU461976
<i>Fomitiporia aethiopica</i>	MUCL 44777	Ethiopia	Decock, Bitew & G. Castillo	GU478341
<i>Fomitiporia aethiopica</i>	MUCL 44806	Ethiopia	Decock, Bitew & G. Castillo	GU461944
<i>Fomitiporia punicata</i>	Cui 23	China	Y.C. Dai, B.K. Cui & Decock	GU461974
<i>Fomitiporia punicata</i>	Cui 26	China	Y.C. Dai, B.K. Cui & Decock	GU461975
<i>Fomitiporia polymorpha</i>	MUCL 46166	USA	M. Fischer	GU461955
<i>Fomitiporia polymorpha</i>	MUCL 46167	USA	M. Fischer	GU461956
<i>Fomitiporia punctata</i>	MUCL 34101	Germany	Murrill	GU461947
<i>Fomitiporia punctata</i>	MUCL 47629	Japan	Murrill	GU461950
<i>Fomitiporia robusta</i>	MUCL 51327	Czech	Fiasson & Niemela"	GU461993
<i>Fomitiporia bannaensis</i>	MUCL 45926	Thailand	Y.C. Dai	GU461942
<i>Fomitiporia bannaensis</i>	MUCL 46950	China	Y.C. Dai	GU461943
<i>Fomitiporia tenuis</i>	MUCL 44802	Ethiopia	Decock, Bitew & G. Castillo	GU461957
<i>Fomitiporia tenuis</i>	MUCL 49948	Uganda	Decock, Bitew & G. Castillo	GU461958
<i>Fomitiporia maxonii</i>	MUCL 46017	Cuba	Murrill	EF433559
<i>Fomitiporia maxonii</i>	MUCL 46037	Cuba	Murrill	EF433560
<i>Fomitiporia langloisii</i>	MUCL 46375	USA	Murrill	EF429242
<i>Fomitiporia langloisii</i>	MUCL 46165	USA	Murrill	AY340026
<i>Fomitiporia "sp."</i>	CBS 386.66 5	Argentina		EF433563
<i>Fomitiporia dryophila</i>	MUCL 46380	USA	Murrill	EF429238
	MUCL 46379	USA	Murrill	EF429240
<i>Fomitiporia apiahyna</i>	MUCL 51451	Ecuador	Amalfi, Robledo & Decock	GU461963
	MUCL 51485	Ecuador	Amalfi, Robledo & Decock	GU461962
<i>Fomitiporia tabaquilio</i>	MUCL 46230	Argentina	Urcelay, Robledo & Rajchenb.	GU461940
	MUCL 47754	Argentina	Urcelay, Robledo & Rajchenb.	GU461941
<i>Fomitiporia australiensis</i>	MUCL 49406	Australia	Fischer, Edwards, Cunningt. & Pascoe	AY624997

CHAPITRE II : METHODOLOGIE

<i>Fomitiporia nobilissima</i>	MUCL 51290	Gabon	Decock & Yombiyeni	GU461964
	MUCL 51289	Gabon	Decock & Yombiyeni	GU461965
<i>Fomitiporia gabonensis</i>	MUCL 47576	Gabon	Amalfi & Decock	GU461971
	MUCL 51291	Gabon	Amalfi & Decock	GU461967
<i>Fomitiporia ivindoensis</i>	MUCL 51311	Gabon	Decock, Amalfi & Yombiyeni	GU461952
	MUCL 51312	Gabon	Decock, Amalfi & Yombiyeni	GU461951
<i>Fomitiporia hippophaeicola</i>	MUCL 31746	Belgium	Fiasson & Niemela	GU461945
<i>Fomitiporia hippophaeicola</i>	MUCL 31747	Belgium	Fiasson & Niemela	GU461946
<i>Fomitiporella sp.</i>	Oe6	Ethiopia	Addisu Assefa	JF895467
<i>Fomitiporella sp.</i>	Oe5	Ethiopia	Addisu Assefa	JF895466
<i>Phellinus mori</i>	Unknown	Unknown	Unknown	FJ627259

3.3.5. Construction des arbres phylogénétiques

Plusieurs arbres phylogénétiques ont été construits dans cette étude sur la base des séquences nucléotidiques des ITS, des gènes du facteur d'élongation, de la β -tubuline et de l'actine.

Les analyses phylogénétiques des données de séquences ont été réalisées en utilisant le programme PAUP * (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) vers. 4.0b10 (Swofford, 2003). Deux méthodes de reconstruction d'arbres phylogénétiques ont été appliquées en parallèle, la méthode du Neighbour-Joining (NJ) (méthode du plus proche voisin basée sur la ressemblance globale entre les séquences) et la méthode de maximum de parcimonie (MP) (méthode basée sur les caractères). Ces deux modèles ont préalablement été utilisés pour l'analyse de séquences des différents genres obtenus dans cette étude (Gramaje *et al.*, 2009 ; Chen *et al.*, 2011 ; Trouillas *et al.*, 2011 et Urbez-Torres *et al.*, 2011b).

Les arbres sont érigés en maximum de parcimonie (MP) et identifiés par recherche heuristique qui permettra de rechercher un arbre s'approchant de l'optimal, en utilisant la méthode *Tree-Bisection-Reconnection* (TBR) de l'algorithme de réarrangement des branches (*branch swapping*). D'autres mesures ont été utilisées, l'indice de cohérence (IC), l'indice de rétention (RI) et l'indice d'homoplasie (HI) ; les trous (*gaps*) étant traités comme des données manquantes. La robustesse des topologies (des nœuds) de MP est estimée par les procédures de "bootstrap" en utilisant 1000 répétitions (full heuristic search) (Hillis and Bull, 1993).

La construction de ces arbres phylogénétiques est réalisée contre un groupe externe (outgroup). Le choix de l'outgroup est important, le groupe externe doit être une séquence primitive au groupe étudié et qui ne doit être ni trop proche (afin d'augmenter la résolution de l'analyse), ni trop éloignée des autres séquences. Les taxons outgroups sélectionnés pour l'enracinement des arbres sont présentés dans le tableau 18.

3.3.5.1. Analyses simultanées des séquences

Deux gènes ont été séquencés pour chacun des *Botryosphaeriaceae* spp. et des *Phaeoacremonium* spp. Les propriétés de chacun de ces gènes ont été évaluées. La stratégie de leur analyse phylogénétique se fonde sur les avantages respectifs des analyses séparées et simultanées. L'analyse simultanée permet non seulement de mieux révéler les conflits entre données, mais aussi de tirer profit de la combinaison synergique de certains caractères, à savoir le renforcement de la robustesse de certains nœuds de l'arbre phylogénétique qui n'étaient pas ou peu soutenus par les analyses séparées.

Tableau 18 : Données des espèces outgroups utilisées pour la reconstruction des arbres phylogénétiques

Arbres Phylogénétiques	Genre	Espèces outgroups	Reference	N° d'accension GenBank			
				ITS	EF1- α	β -tubuline	Actine
I	<i>Diplodia et</i>	<i>Dothiorella sarmentorum</i>	CBS 115038	AY573206	AY573223	XXXXXXXX	XXXXXXXX
	<i>Lasidiplodia</i>	<i>Spencermartinsia sp.</i>	CBS 117006	AY905555	AY905562	XXXXXXXX	XXXXXXXX
II	<i>Fusicoccum et</i>	<i>Diplodia mutila</i> ("B. <i>stevensii</i> ")	CBS112553	AY259093	AY573219	XXXXXXXX	XXXXXXXX
	<i>Neofusicoccum</i>	<i>Diplodia seriata</i> ("B. <i>obtusa</i> ")	CBS112555	AY259094	AY573220	XXXXXXXX	XXXXXXXX
III	<i>Eutypa</i>	<i>Diatrype sp.</i>	D-Ca-100	AY684239	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
VI	<i>Phaeoconiella</i>	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	CBS100397	AF197981	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
		<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	CBS 246.91	AF017651	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
V	<i>Fomitiporia</i>	<i>Phellinus uncisetus</i>	MUCL 46231	GU461960	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
		<i>Phellinus uncisetus</i>	MUCL 47061	GU461972	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
IV	<i>Phaeoacremonium</i>	<i>Pleurostomophora richardsiae</i>	CBS 270.33	XXXXXXXX	XXXXXXXX	AY579334	AY579271
		<i>Wuestneia molokaiensis</i>	CBS 114877	XXXXXXXX	XXXXXXXX	AY579272	AY579335

Cependant, il s'avère davantage informatif d'unir les résultats de séquençage de plus d'un gène (Cunningham, 1997 et Barker et Lutzoni, 2002).

La possibilité de combiner l'ensemble des données des ITS et l'EF1- α pour les *Botryosphaeriaceae* et la β -tubuline et l'actine pour les *Phaeoacremonium* a été évaluée en comparant les clades fortement soutenus parmi les arbres générés des analyses séparées. Une fiabilité se réfère généralement à des valeurs de bootstrap $\geq 70\%$ (Alfaro et al., 2003). Si aucun conflit n'existe entre les clades fortement soutenus dans les arbres générés, il est probable que les gènes partagent une histoire phylogénétique similaire et la fiabilité phylogénétique pourrait finalement être augmentée en combinant l'ensemble des données en mettant bout à bout les séquences des différents gènes pour chaque espèce (Miller et Huhndorf, 2004).

3.3.5.2. Visualisation des arbres phylogénétiques

Quelle que soit la méthode de construction de l'arbre, les données ont été visualisées avec le logiciel TreeView (Page, 1996). Seuls les arbres issus de la méthode MP sont visualisés dans ce manuscrit et les nœuds communs aux deux méthodes sont indiqués par un astérisque. Seuls les bootstraps d'une valeur supérieure à 50% sont indiqués dans les arbres.

3.4. Caractérisation morphologique et culturelle des isolats

En complément de la caractérisation moléculaire, nous avons procédé à la caractérisation morphologique et culturelle des espèces appartenant aux différents genres identifiés dans cette étude. Ainsi, des isolats représentatifs des différents clades phylogénétiques, ont été repiqués, purifiés et caractérisés par des observations macroscopiques et microscopiques.

3.4.1. Caractères cultureux et aspect morphologique des colonies

L'ensemble des espèces de la famille des *Botryosphaeriaceae*, des genres *Eutypa*, *Phaeomoniella* et *Fomitiporia* ont été cultivés sur le milieu PDA à 25°C tels que décrits par Luque et al. (2009), à l'exception des *Phaeoacremonium* qui, en plus du milieu PDA, ont été cultivées sur les milieux malt-agar (MEA) et oatmeal agar (OA; Gams et al., 2007) (Annexe 2). Les descripteurs retenus pour caractériser l'aspect culturel des thalles et la morphologie des cultures sont : l'aspect général du mycélium aérien, sa couleur, par utilisation des tableaux des codes de couleur de Rayner (1970), le caractère régulier ou non de la marge des colonies et éventuellement la présence de pigment dans le milieu de culture.

3.4.2. Etude morpho-taxonomique en microscopie photonique

Les isolats des différents genres ont été également caractérisés sur la base de leurs caractéristiques micromorphologiques. Ont été pris en considération : la morphologie des conidiophores, le type, la forme et la taille des phialides, ainsi que les dimensions, la forme, la pigmentation et le cloisonnement des conidies. Les souches ont été repiquées sur le milieu PDA et incubées à 25°C à l'obscurité pendant 2 à 3 semaines, selon la méthode décrite par Mostert et *al.* (2006a). Le mycélium est prélevé à l'aide d'un scalpel, puis déposé sur une lame dans une goutte d'eau stérile. La lame est laissée à température ambiante pour permettre l'évaporation de l'eau avant d'appliquer une goutte d'acide lactique à 100% puis couverte avec une lamelle. Toutes les observations micro-morphologiques ont été faites avec un microscope Leica DMR HC équipé d'un contraste de phase de Nomarsky (differential interference contrast illumination). Des images numériques ont été prises avec un appareil à photo Leica DFC 320. Les dimensions de conidies telles que la longueur, la largeur et le ratio ont été déterminés. Les mesures ont été réalisées avec le module de mesure Leica IM500 (image manager measurement module), sur 20 à 50 conidies de chaque isolat, à partir d'images prises avec l'objectif 100X. La moyenne, l'écart type et les intervalles de confiance à 95% ont été aussi calculés. Les dimensions des conidies sont présentées comme des intervalles de confiance à 95% avec des dimensions minimales et maximales entre parenthèses, suivi par les valeurs moyennes et l'écart standard.

3.4.3. Induction de la sporulation sur aiguilles de pin

La sporulation chez les *Botryosphaeriaceae* et *Eutypa lata* a été induite par la culture des isolats sur des aiguilles de pin doublement autoclavées et mises dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée à 2%. Les boîtes sont incubées à 25°C avec une photopériode de 12 heures pendant 2 à 6 semaines. Ainsi avec un milieu nutritif pauvre, les champignons développent des fructifications sur le substrat solide, à savoir les aiguilles de pin (Fig. 12). Cette technique a été employée avec succès à de telles fins par Phillips et *al.* (2006), Abdollahzadeh et *al.* (2009 ; 2010) sur les *Botryosphaeriaceae* et par Santos et Phillips (2009) sur les *Diaporthes*. La couche des pycnides est disséquée horizontalement et le contenu transféré sur une lame dans une goutte d'eau stérile. La lame est laissée à température ambiante pour permettre l'évaporation de l'eau, avant d'appliquer une goutte d'acide lactique à 100%. Les conditions d'observations et de mesures sont les mêmes que celles décrites précédemment (paragraphe 3.2).



Fig. 12 a: Préparation des aiguilles de pin pour l'autoclavage; b: Aiguilles de pin avec des Pycnides

3.4.4. Mesure de la vitesse de croissance mycélienne et optimum thermique

La vitesse de croissance mycélienne à 25°C a été mesurée simultanément à l'étude morpho-taxonomique. Pour cela, la croissance des thalles a été appréciée en boîte de Pétri (90 mm) sur milieu PDA, par mesure de 2 diamètres perpendiculaires, après 8 jours d'incubation pour les espèces de *Phaeoacremonium*, *Phaeomoniella* et *Fomitiporia*, comme décrit par Mostert et al. (2006) et Pilotti et al. (2010). En ce qui concerne les *Botryosphaeriaceae*, les mesures ont été prises après 48 heures d'incubation (Phillips et al., 2008). La vitesse de croissance des isolats d'*Eutypa* a été calculée après 24 heures d'incubation, conditions préconisées par Trouillas et Gubler (2004).

Les températures optimales de croissance ont été déterminées par l'incubation des souches dans l'obscurité à des températures allant de 5°C à 40°C y compris celle de 37°C afin de simuler la température du corps humain (Mostert et al., 2006 ; Abdollahzadeh et al., 2010 et Mehl et al., 2011).

CHAPITRE III. RESULTATS

CHAPITRE III. RESULTATS

I. EPIDEMIOLOGIE ET DYNAMIQUE SPATIO-TEMPORELLE DE L'EUTYPIOSE ET L'ESCA

1. Symptômes foliaires de l'eutypiose et de l'esca observés sur le terrain

Les symptômes sur les parties herbacées ont constitué, lors de nos enquêtes, la manifestation la plus évidente de la présence de l'eutypiose et de l'esca.

Durant nos premières observations effectuées le mois de mai, au niveau des différentes parcelles, nous avons constaté la présence de symptômes d'eutypiose qui se manifestaient par un rabougrissement de la végétation avec un aspect buissonnant (Fig. 13a). Les feuilles étaient petites, enroulées ou déformées, parfois jaunâtres et nécrosées sur le bord. Ces symptômes ont été observés sur le cep entier ou uniquement sur un seul bras. Dans ce dernier cas, les autres bras présentaient un feuillage normal, ce qui masquait le bras malade au fur et à mesure que la végétation se développait (Fig. 13b) ; le cas de bras mort a été observé au niveau des différents vignobles. Ce phénomène se traduisait chez certains ceps, par l'absence totale de pousses vertes, alors que le reste de la souche se développait normalement (Fig. 14 a). Nous avons également constaté la présence de ceps complètement dépéris dans l'ensemble des vignobles (Fig. 14 b).

Les symptômes observés lors de la deuxième enquête, effectuée en Juillet-Août, sont attribués à l'esca qui s'est manifestée au niveau des différentes parcelles sous ses deux formes, lente et foudroyante. Dans le cas de la forme lente, les feuilles de la base étaient souvent atteintes en premier, montrant des dessiccations internervaires donnant un aspect marbré au feuillage (Fig. 15 a). Les nécroses étaient entourées d'un liseré rouge caractéristique des cépages noirs (Mugnai et *al.*, 1999) (Fig. 15 b). Les grappes étaient également touchées, les baies restaient petites et mûrissaient mal ou bien elles se desséchaient (Fig. 15 c et d). Ces altérations ont été observées sur une partie et parfois sur la totalité du cep.

La forme apoplectique ou foudroyante a été observée au niveau de l'ensemble des parcelles prospectées. Elle se traduisait par un dessèchement brutal d'une partie ou de l'ensemble du cep, souvent chargé de fruits (Fig. 16 a et b). Il est également important de signaler la présence de ceps qui présentaient à la fois, les deux types de symptômes au niveau de la végétation (rabougrissement dans le cas de l'eutypiose et marbrure des feuilles dans le cas de la forme lente de l'esca).



Fig. 13 a : Symptômes d'eutypiose sur les parties herbacées b : Symptôme d'eutypiose sur un seul bras

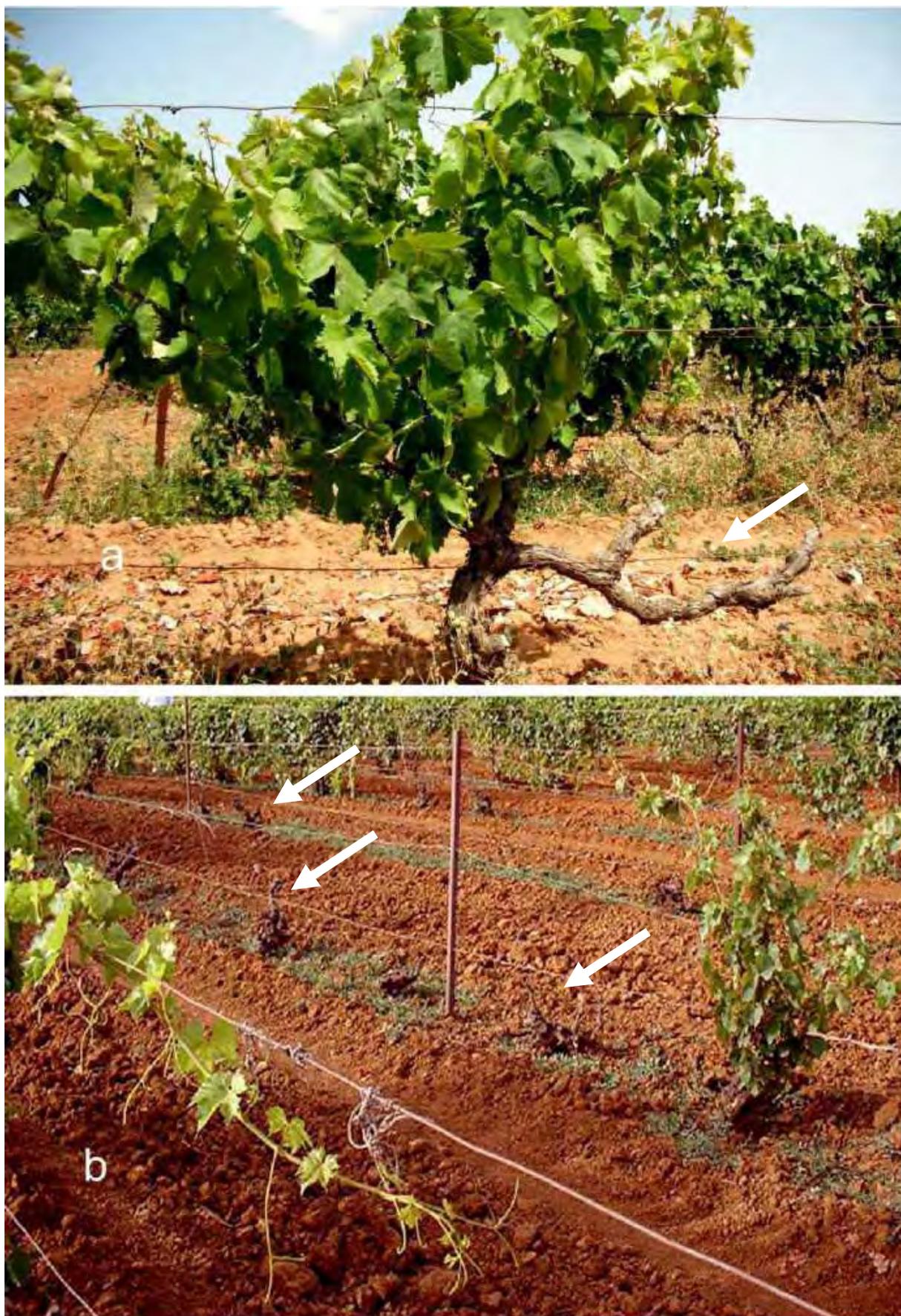


Fig. 14 a : Cep avec un bras mort b : Nombre important de ceps dépéris



*Fig. 15 a,b : Symptômes sur feuille de cépage noir c,d : Symptômes d'esca sur fruits
e : Forme lente de l'esca*



Fig. 16 a : Forme apoplectique de l'esca b : Dessèchement brutal d'un cep chargé de fruits

2. Estimation des dépérissements au niveau des vignobles : Bilan des enquêtes 2006, 2007, 2008

Le suivi de l'eutypiose et de l'esca dans les différentes parcelles a été réalisé pendant trois années consécutives (2006, 2007, 2008). Pendant la première année, l'ensemble des parcelles ont pu être prospectés. En 2007, deux parcelles n'ont pas été notées puisqu'elles ont été arrachées. En 2008, suite à l'arrachage sans avertissement de trois autres vignobles par leur propriétaire, le bilan n'a concerné que cinq parcelles parmi les dix. Le tableau 19 montre les différentes parcelles ainsi que les périodes de notation des symptômes de dépérissement.

Tableau 19: Parcelles, année de prospection et nombre de ceps considéré

Parcelles	2006	2007	2008
CHA	500	0	0
CHB	500	0	0
CHC	500	500	500
CHD	500	500	500
CHE	500	500	0
CHF	500	500	500
CHG	500	500	0
CHH	500	500	0
CHI	500	500	500
CHJ	500	500	500

2.1. Taux d'expression des symptômes de l'eutypiose, de l'esca, des bras morts et de la mortalité pour l'année 2006

Les observations réalisées dans les différentes parcelles ont révélé des taux de dépérissement pouvant être très importants. Le pourcentage de ceps morts varie de 13,2% à 49,8%, selon les parcelles. Pour les dix parcelles observées, le pourcentage moyen calculé pour les 5000 ceps est de 27,5%. Cela signifie que plus d'un quart des vignes était absent. La présence des symptômes typiques d'eutypiose a été observée dans l'ensemble des parcelles. En moyenne, 11,5% des ceps étaient atteints. La figure 17 montre des variations dans l'expression des symptômes. Ainsi, les taux varient de 2,8% à 21%. Les symptômes typiques de l'esca ont été observés dans toutes les parcelles avec des taux allant de 0,4% à 4,4%. Le taux moyen d'expression dans l'ensemble des parcelles est de l'ordre de 1,9%. Ce taux reste beaucoup moins important, comparé au taux d'expression des symptômes d'eutypiose. La présence du bras mort au niveau des ceps a été observée dans toutes les parcelles avec de larges fluctuations de fréquences allant de 0,4 à 14%.

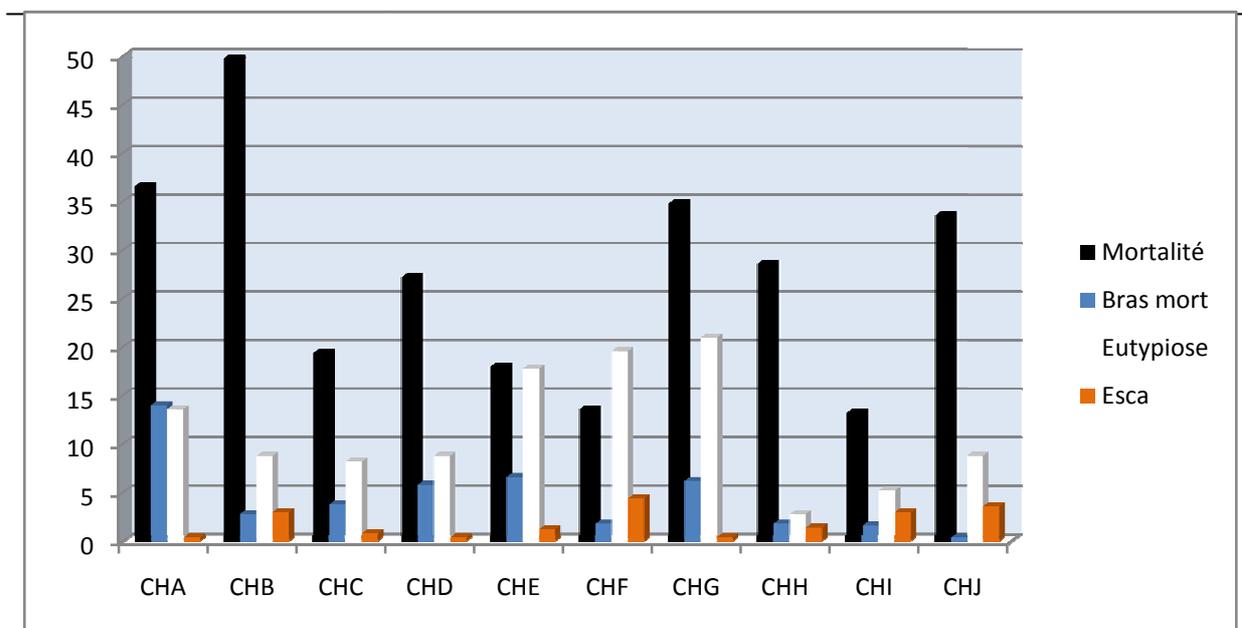


Fig. 17 : Pourcentage de ceps morts, présentant des symptômes d'eutypiose, d'esca et des bras morts (%) pour l'année 2006

2.2. Taux d'expression des différents symptômes pour l'année 2007

La figure 18 montre les fréquences d'apparition des symptômes de dépérissement au niveau des huit parcelles prospectées en 2007. Les parcelles CHA et CHB qui ont montré les taux les plus élevés de mortalité ont été arrachées après les vendanges de 2006. Les taux d'expression foliaire de l'eutypiose et de l'esca ont globalement suivis une hausse à l'exception de la parcelle CHG qui a montré une légère baisse dans l'expression des symptômes d'eutypiose. En revanche, cette même parcelle a montré un taux assez important de mortalité qui est passé de 34,8% en 2006 à 44,4% en 2007. Le pourcentage moyen des ceps présentant les symptômes d'eutypiose est passé de 11,5% en 2006 pour atteindre 13,8% en 2007. Quant aux symptômes d'esca, le taux qui était de 1,9% en 2006 est passé à 3% en 2007. En ce qui concerne la présence des bras morts au niveau des ceps, il est noté une baisse du taux cumulé qui passe de 4,8% à 3,5%.

2.3. Taux d'expression des différents symptômes pour l'année 2008

Les prospections réalisées en 2008 n'ont concerné que cinq parcelles parmi les dix ; les parcelles arrachées sont celles qui ont présenté une mortalité élevée en 2007 et qui reste assez importante pour l'ensemble des parcelles, atteignant les 30%. La parcelle CHI présente le plus faible taux d'expression des symptômes de dépérissement, avec un taux de mortalité de 19,2% et des taux d'eutypiose et d'esca qui se rapprochent sensiblement (9,8% et 7%). Les taux les plus élevés d'expression des symptômes d'eutypiose et d'esca ont été enregistrés au niveau de la parcelle CHF avec 19% et 7,4% respectivement.

D'une manière générale, nous avons assisté sur quasiment toutes les parcelles à une hausse des taux d'expression des symptômes de dépérissement, à l'exception des bras morts qui n'ont été retrouvés que dans 2,6% de l'ensemble des ceps examinés (Fig. 19).

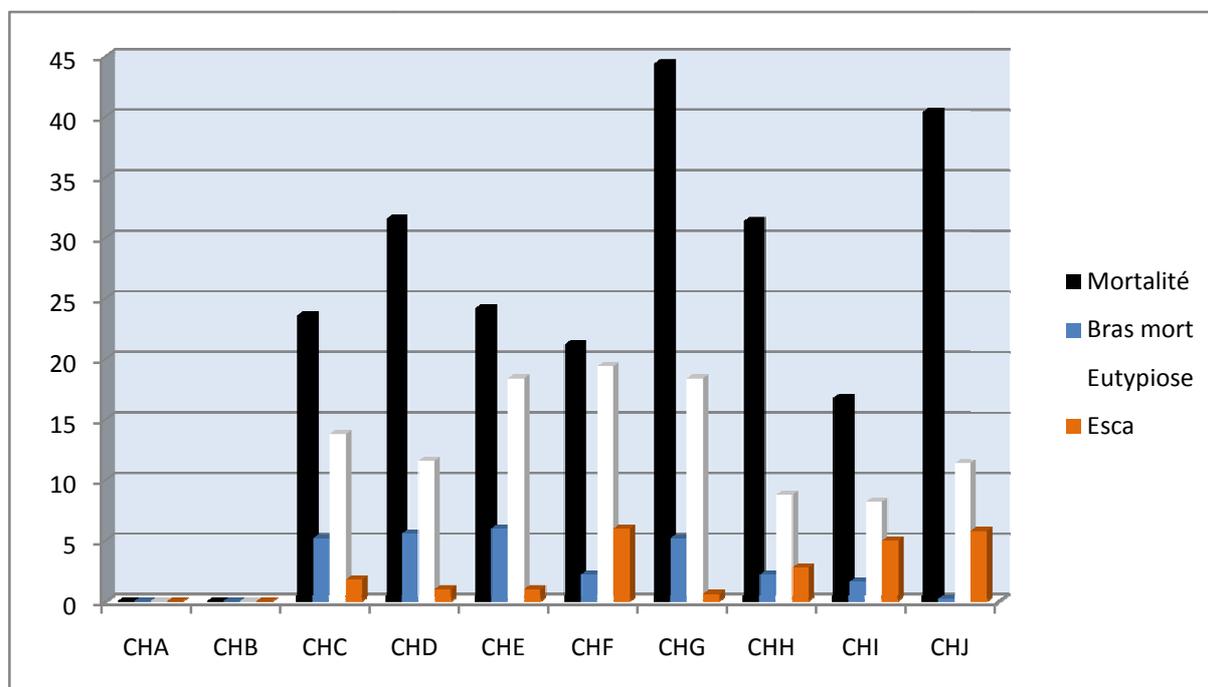


Fig. 18 : Pourcentage de ceps morts, présentant des symptômes d'eutypiose, d'esca et des bras morts (%) pour l'année 2007

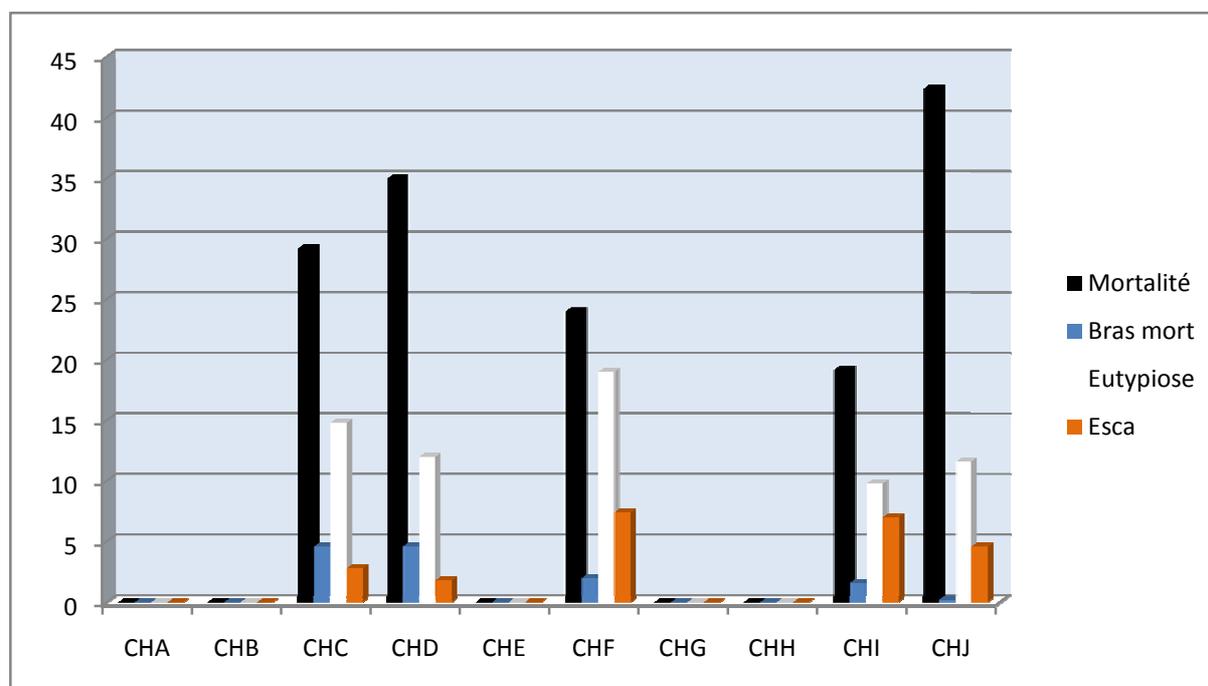


Fig. 19 : Pourcentage de ceps morts, présentant des symptômes d'eutypiose, d'esca et des bras morts (%) pour l'année 2008.

3. Incidences de l'eutypiose aux vignobles

L'évaluation de l'importance réelle de l'eutypiose est calculée par rapport au nombre de pieds vivants. En 2006, les incidences s'échelonnaient de 3,9% (la parcelle CHH) à 32,2% (la parcelle CHG) ; soit une moyenne de 16,06% pour les dix parcelles confondues. Nous observons une hausse du taux des ceps expressifs de l'eutypiose, qui passe à 19,5% en 2007 ; la figure 20 illustre les niveaux d'évolution des incidences dans les différentes parcelles. Ainsi, une progression générale est à signaler dans la majorité des parcelles où la parcelle CHH, qui est la moins touchée en 2006, passe de 3,9% à 12,9%, ce qui représente l'augmentation la plus importante. En 2008, une hausse de l'incidence est aussi notée au niveau des cinq parcelles qui restaient, allant de 18,5% à 25%.

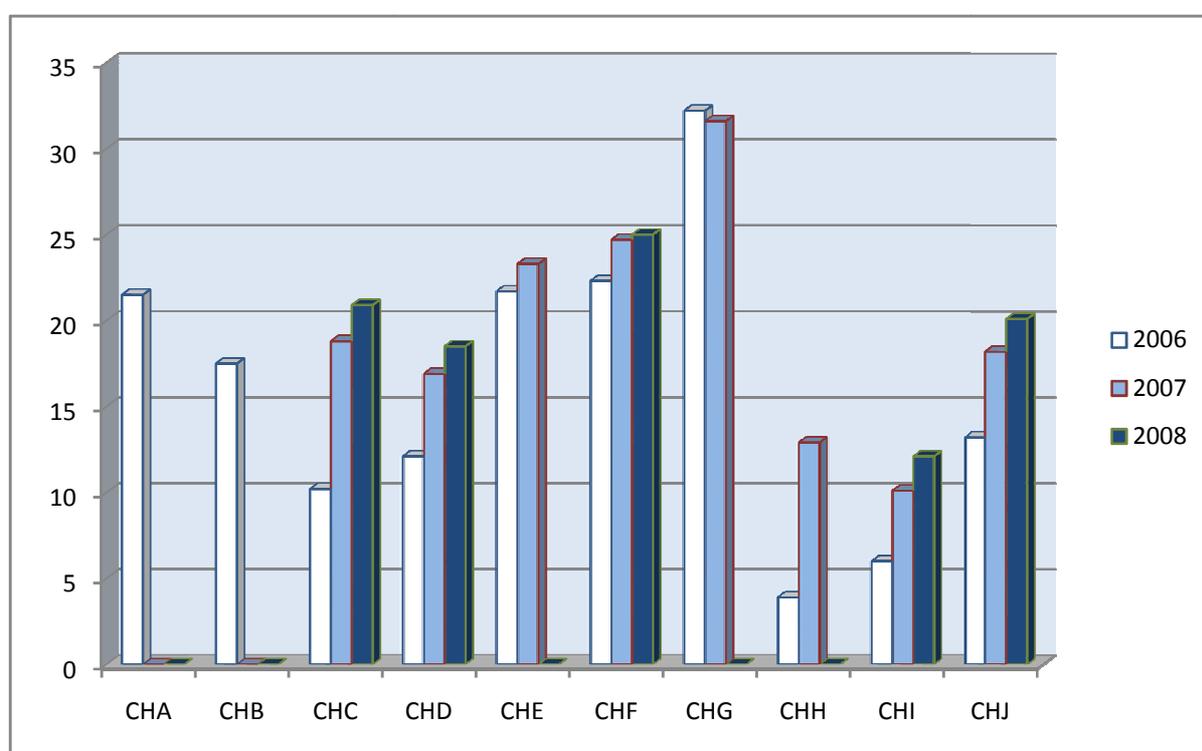


Fig. 20 : Incidences de l'eutypiose dans les différentes parcelles (%)

4. Incidences de l'esca aux vignobles

L'examen du graphique (Fig. 21) révèle une progression de l'incidence de l'esca au fil des années de prospection, exception faite pour des parcelles CHE et CHJ où une légère régression est notée. De manière générale, les incidences de l'esca restent beaucoup plus faibles que celles de l'eutypiose. En 2006, les incidences varient entre 0,5% et 6% et en 2007, ces valeurs ont pratiquement doublées pour la plupart des parcelles prospectées.

En 2008, la même situation est observée au niveau des cinq parcelles qui restaient où l'incidence moyenne enregistrée a atteint 7,48%.

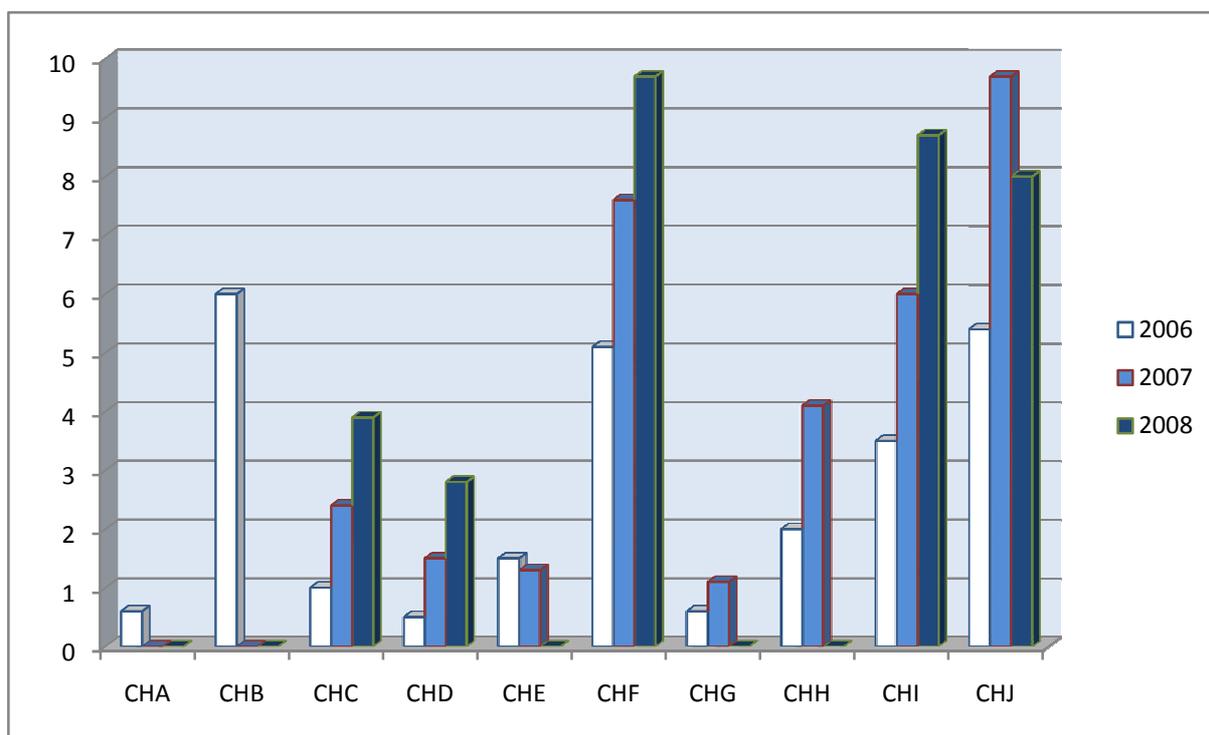


Fig. 21 : Incidences de l'esca dans les différentes parcelles (%)

5. Répartition spatio-temporelle de l'esca, l'eutypiose et de la mortalité

Les études épidémiologiques ont été basées sur l'analyse de la dynamique spatio-temporelle des dépérissements à l'échelle de la parcelle. Différentes matrices de transition ont été réalisées afin de suivre la progression des dépérissements au fil des années (annexe 5). Pour des raisons déjà explicitées, le nombre de ceps morts, eutypiés ou avec des symptômes d'esca cumulé entre 2006 et 2008 n'a pu être estimé que pour cinq parcelles (CHC, CHD, CHF, CHI et CHJ). L'estimation du nombre de cas cumulés entre 2006 et 2007 a été réalisée sur trois parcelles (CHE, CHG, CHH). En fin, pour les parcelles CHA et CHB, l'analyse spatiale n'a pu être réalisée que pour l'année 2006.

5.1. Parcelles observées uniquement en 2006

Dans les parcelles CHA et CHB prospectées uniquement en 2006 et où 1000 ceps ont été examinés, nous avons compté 359 ceps sains, soit 35,9% (sans symptômes externes de maladies du bois) contre 641 ceps (64,1%) exprimant des symptômes de dépérissement. Parmi ces derniers, 432 ceps étaient morts, 18 ceps exprimaient des symptômes d'esca et 191 ceps avaient des symptômes d'eutypiose (Tabl. 20) ; en effet, le nombre de ceps morts est

deux fois plus important que celui des ceps eutypiés ou présentant des symptômes d'esca. Toutefois, en comparant les données des deux types de symptômes, il ressort que les ceps eutypiés étaient environ onze fois plus importants que ceux qui exprimaient de l'esca. La répartition spatiale des ceps morts ou malades est représentée sur des cartographies où chaque cep est représenté par un symbole qui correspond à son état sanitaire (Fig. 22).

L'analyse statistique spatiale a montré qu'il n'y a aucune autocorrélation spatiale positive entre les ceps dans les parcelles CHA et CHB (Fig. 26) ; la mortalité et les symptômes d'eutypiose et d'esca sont répartis au hasard.

Tableau 20: Parcelles CHA et CHB, une année d'observation (1000 ceps)

Esca	Eutypiose	Mort	Sain	Total
18 (1,8%)	191 (19,1%)	432 (43,2%)	359 (35,9%)	1000

5.2. Matrices de transition pour les parcelles observées deux et trois années

5.2.1. Résultats cumulés sur deux années (2006/2007)

Dans les trois parcelles CHE, CHG et CHH, prospectées durant les années 2006 et 2007, la proportion de ceps morts au début du suivi était de 407 parmi les 1500 ceps examinés, soit 27,1%. En 2007, le nombre a atteint 500 ceps (33,3%), soit une perte de 93 ceps durant la période 2006/2007. Parmi les 500 ceps morts, 407 étaient déjà morts, 4 (0,3%) présentaient de l'esca, 62 (4,1%) avaient de l'eutypiose et 27 (1,8%) étaient sains (Tabl. 21).

En 2006, 276 ceps avaient de l'eutypiose et en 2007, 213 (14,2%) de ces ceps montraient toujours de l'eutypiose, 62 ceps (4,1%) étaient morts et un cep n'avait pas montré de symptômes de dépérissement. Le nombre de ceps qui montraient de l'esca en 2006 était de 15, soit 1% et en 2007, 10 de ces ceps montraient également de l'esca, 1 cep avait de l'eutypiose et 4 ceps sont morts. La cartographie de chaque parcelle permet d'observer la répartition des ceps morts en 2006 et les ceps ayant montré au moins une fois de l'eutypiose ou de l'esca au cours de la période 2006/2007 (Fig. 23).

L'analyse statistique spatiale des trois parcelles a détecté une autocorrélation positive au seuil $0,5 \times 10^{-3}$ pour la mortalité dans la parcelle CHH et aucun test significatif pour les parcelles CHE et CHG indiquant une répartition au hasard de la mortalité dans ces dernières (Fig. 27).

En ce qui concerne les ceps eutypiés, notons une autocorrélation positive au seuil $0,5 \times 10^{-3}$ au niveau des trois parcelles. Ces tests sont significatifs uniquement pour les ceps immédiatement voisin sur la ligne, c'est-à-dire à une distance d'1 mètre dans la parcelle CHE

et CHG et 1,5 m dans la parcelle CHH (Fig. 27). Aucun test positif n'a été détecté au niveau des trois parcelles, pour les symptômes d'esca (Fig. 27).

Tableau 21: Nombre de ceps correspondant aux dix transitions entre la première et la deuxième année (parcelles CHE, CHG, CHH (1500 ceps))

	Esca	Eutypiose	Mort	Sain	Total (2006)
Esca	10 (0,7%)	1 (0,1%)	4 (0,3%)	0	15 (1%)
Eutypiose	0	213 (14,2%)	62 (4,1%)	1 (0,1%)	276 (18,4%)
Mort	0	0	407 (27,1%)	0	407 (27,1%)
Sain	11 (0,7%)	77 (5,1%)	27 (1,8%)	687 (45,8%)	802 (53,5%)
Total (2007)	21 (1,4%)	291 (19,4%)	500 (33,3%)	688 (45,9%)	1500 (100%)

5.2.2. Résultats cumulés sur trois années (2006/2007/2008)

Les tableaux 22, 23 et 24 montrent les résultats des matrices de transitions des cinq parcelles prospectées durant les trois années (2006/2007/2008). Les données des cinq parcelles ont été groupées (2500 ceps). Ainsi, le nombre de ceps morts en 2006 était de 535 ceps, soit 21,4%; en 2008, le nombre a atteint 749, soit 30% et de ce fait, 214 ceps ont été perdus durant les trois années d'observation. Parmi ces derniers, 133 ceps étaient morts durant la période 2006/2007 et 81 ceps durant la période 2007/2008.

Parmi les 214 ceps morts en 2008, 10 ceps présentaient de l'esca en 2006, 110 ceps avaient de l'eutypiose et 49 étaient sains. En ce qui concerne l'esca, en 2006, 62 ceps montraient des symptômes de l'esca. En 2008, 50 de ces ceps montraient également de l'esca, 2 ceps avaient de l'eutypiose et 10 étaient morts.

Pour ce qui est de l'eutypiose, en 2006, 314 ceps étaient eutypiés ; en 2008, 200 ceps montraient encore de l'eutypiose, 3 ceps avaient de l'esca, 1 cep était sain et 110 étaient morts. La cartographie de chaque parcelle permet d'observer la répartition des ceps morts en 2006 et les ceps ayant montré au moins une fois de l'eutypiose ou de l'esca au cours de la période 2006/2007/2008 (Fig. 24 et 25).

L'analyse statistique spatiale des cinq parcelles, observées durant les trois années, n'a détecté aucun test significatif pour la mortalité, sauf dans la parcelle CHC où une autocorrelation positive a été mise en évidence également pour les ceps immédiatement voisin sur le rang, soit à une distance d'un mètre (Fig. 28). En ce qui concerne les ceps eutypiés, une autocorrelation positive au seuil $0,5 \times 10^{-3}$ a été détectée au niveau des cinq parcelles, avec

l'indication que le cep immédiatement voisin sur la ligne d'un cep eutypié a plus de chances d'être également malade (Fig. 28). Pour ce qui est de l'esca, c'est uniquement au niveau de la parcelle CHI où une agrégation, limitée au seul cep voisin sur la ligne a été retrouvée (Fig. 28).

➤ *Transitions 2006/2007*

Tableau 22 : Nombre de ceps correspondant aux dix transitions 2006/2007 (parcelles CHC, CHD, CHF, CHI et CHJ (2500 ceps)

	Esca	Eutypiose	Mort	Sain	Total (2006)
Esca	55 (2,2%)	2 (0,1%)	5 (0,2%)	0	62 (2,5%)
Eutypiose	4 (0,2%)	230 (9,2%)	79 (3,2%)	1 (0,0%)	314 (12,6%)
Mort	0	0	535 (21,4%)	0	535 (21,4%)
Sain	43 (1,7%)	155 (6,2%)	49 (2 %)	1342 (53,7%)	1589 (63,6%)
Total (2007)	102 (4,1%)	387 (15,5%)	668 (26,7%)	1343 (53,7%)	2500 (100%)

➤ *Transitions 2007/2008*

Tableau 23 : Nombre de ceps correspondant aux dix transitions 2007/2008 (parcelles CHC, CHD, CHF, CHI et CHJ (2500 ceps)

	Esca	Eutypiose	Mort	Sain	Total (2007)
Esca	84 (3,4%)	0	17 (0,7%)	1 (0%)	102 (4,1%)
Eutypiose	1 (0%)	340 (13,6%)	46 (1,8%)	0	387 (15,5%)
Mort	0	0	668 (26,8%)	0	668 (26,7%)
Sain	38 (1,5%)	52 (2,1%)	18 (0,7%)	1235 (49,4%)	1343 (53,7%)
Total (2008)	123 (4,9%)	392 (15,5%)	749 (30%)	1236 (49,4%)	2500 (100%)

➤ *Transitions 2006/2008*

Tableau24 : Nombre de ceps correspondant aux dix transitions 2006/2008 (parcelles CHC, CHD, CHF, CHI et CHJ (2500 ceps)

	Esca	Eutypiose	Mort	Sain	Total (2006)
Esca	50 (2%)	2 (0,1%)	10 (0,4%)	0	62 (2,5%)
Eutypiose	3 (0,1%)	200 (8%)	110 (4,4%)	1 (0%)	314 (12,6%)
Mort	0	0	535 (21,4%)	0	535 (21,4%)
Sain	70 (2,8%)	190 (7,6%)	94 (3,8%)	1235 (49,4%)	1589 (63,6%)
Total (2008)	123 (4,9%)	392 (15,7%)	749 (30%)	1236 (49,4%)	2500 (100%)

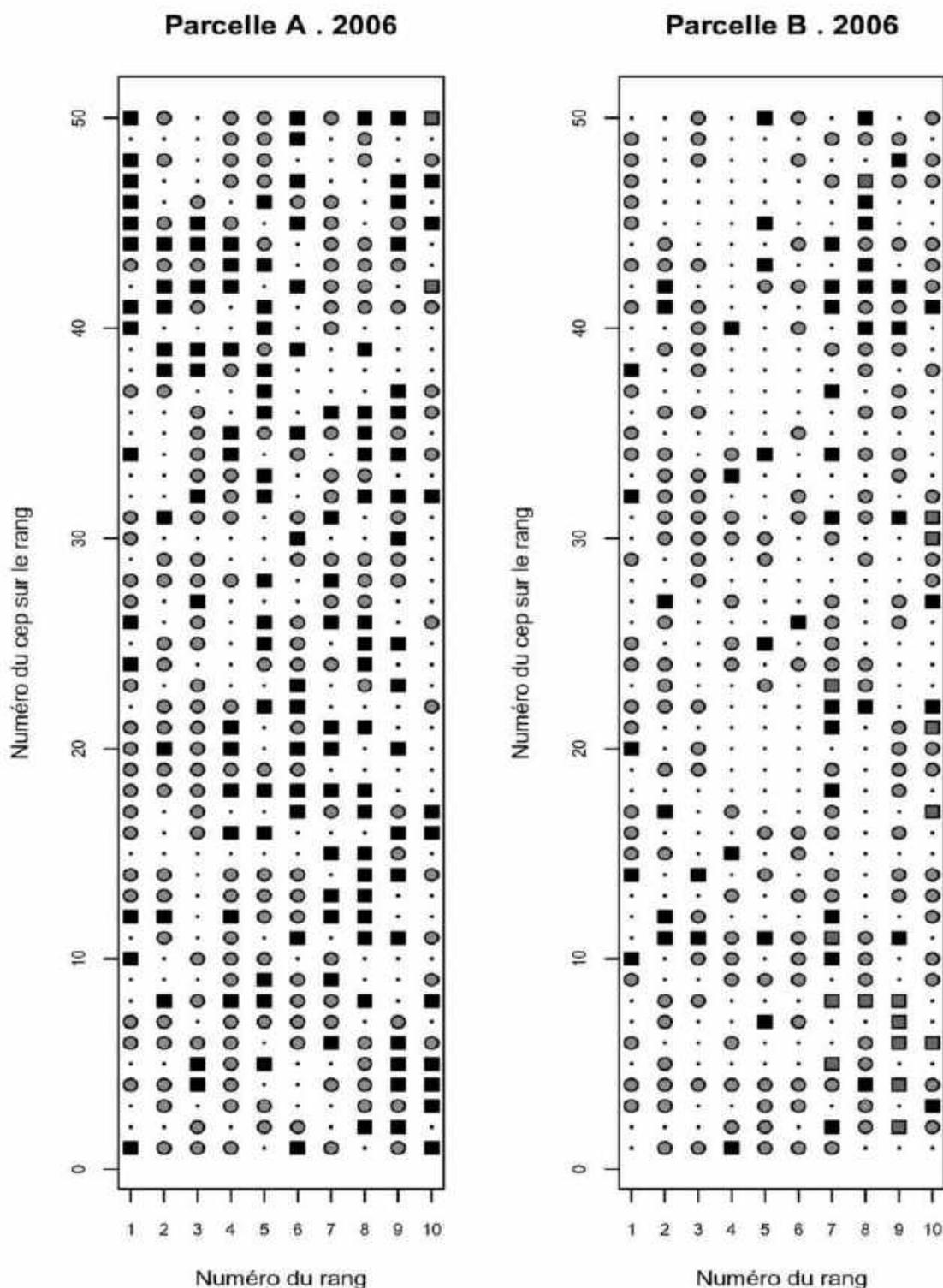


Fig. 22 : Cartographie 2006 des parcelles CHA et CHB (les points représentent les manquants ou morts, cercle gris: les ceps sains, carré noir: eutipiose (cumul bras mort et symptômes), carré gris: esca).

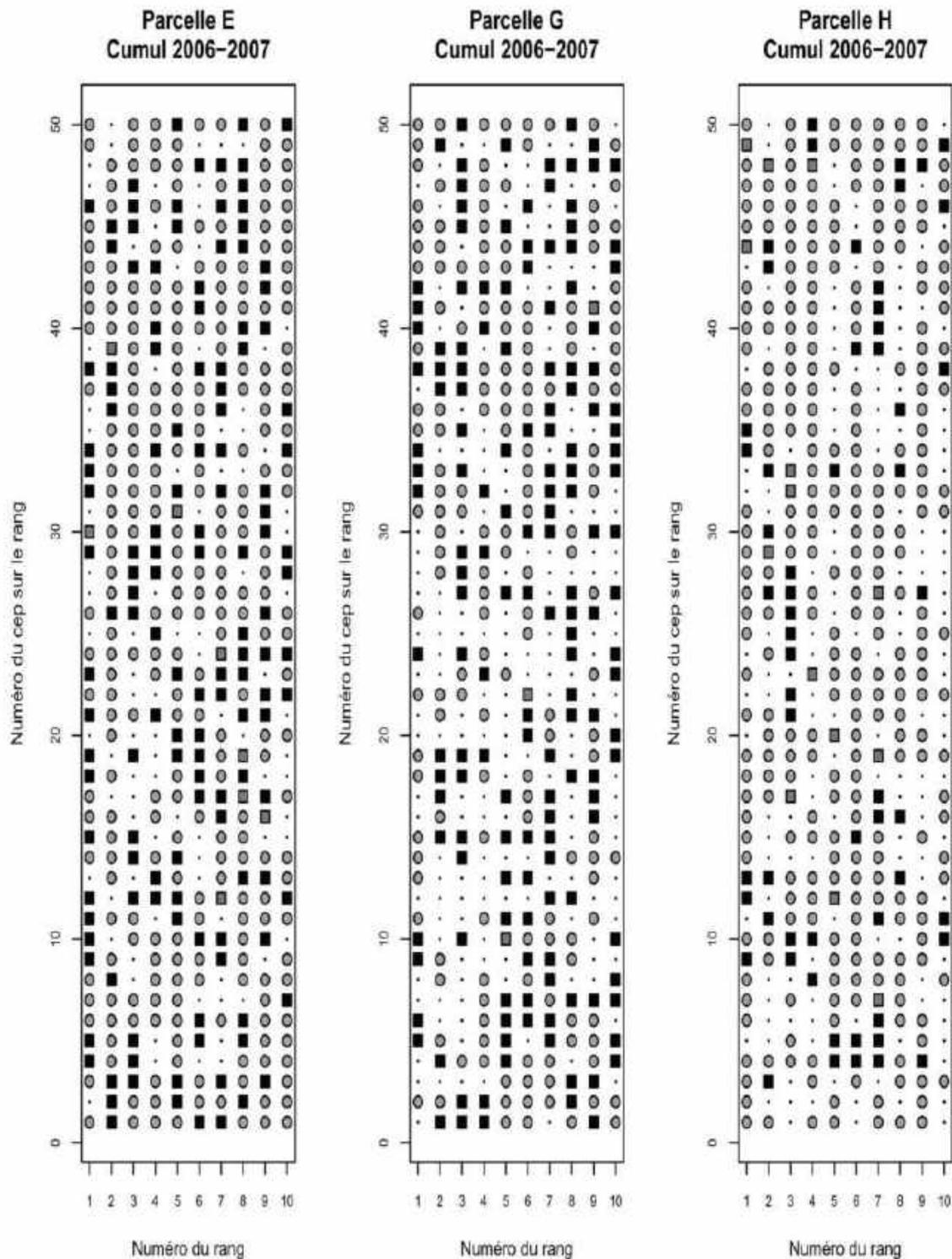


Fig. 23 : Cartographies du cumul 2006 et 2007 des parcelles CHE, CHG et CHH (les points représentent les manquants ou morts, cercle gris: les ceps sains, carré noir: eutypiose (cumul bras mort et symptômes), carré gris: esca).

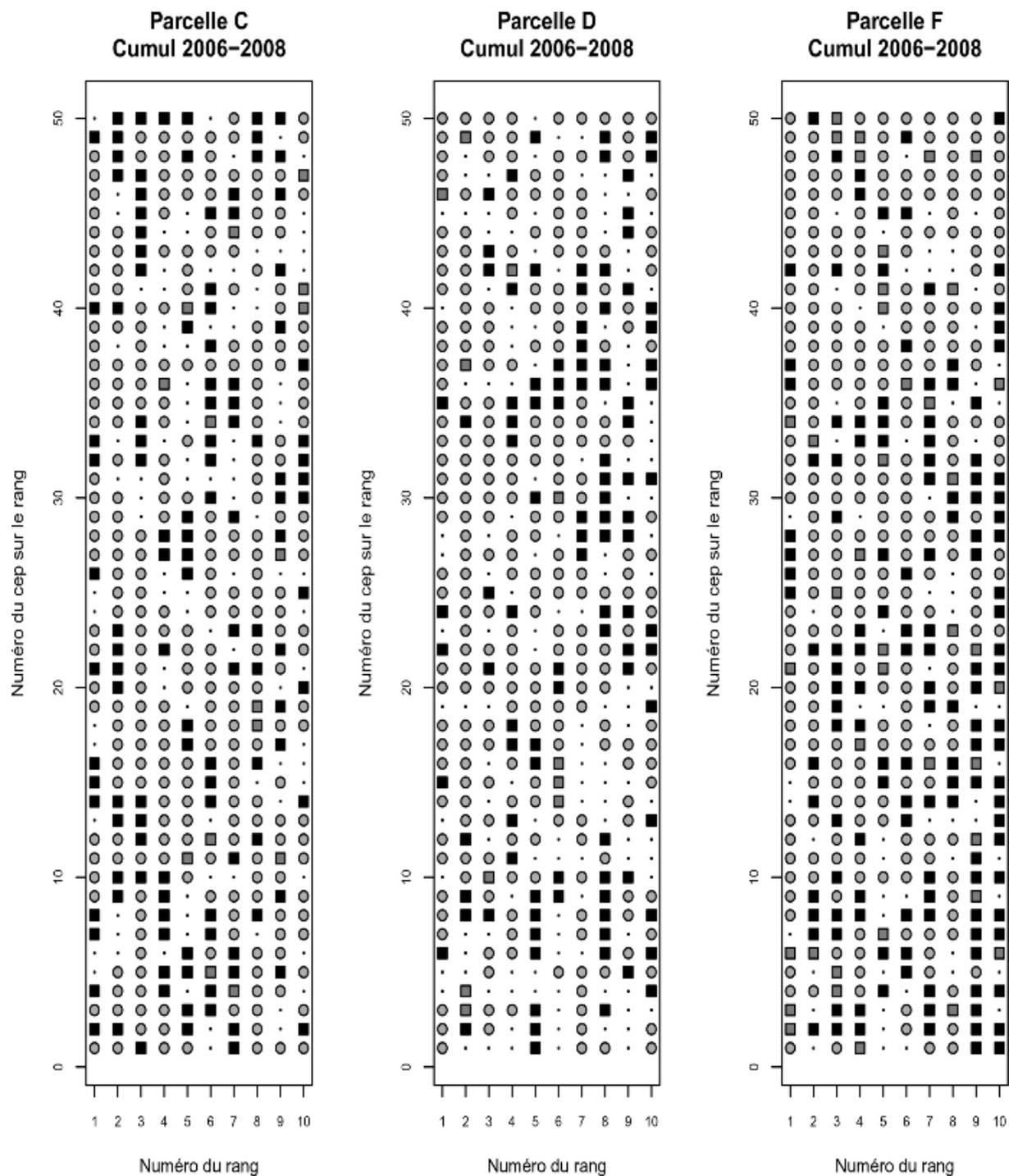


Fig. 24 : Cartographies du cumul 2006, 2007 et 2008 des parcelles CHC, CHD et CHF (les points représentent les manquants ou morts, cercle gris: les ceps sains, carré noir: eutypiose (cumul bras mort et symptômes), carré gris: esca).

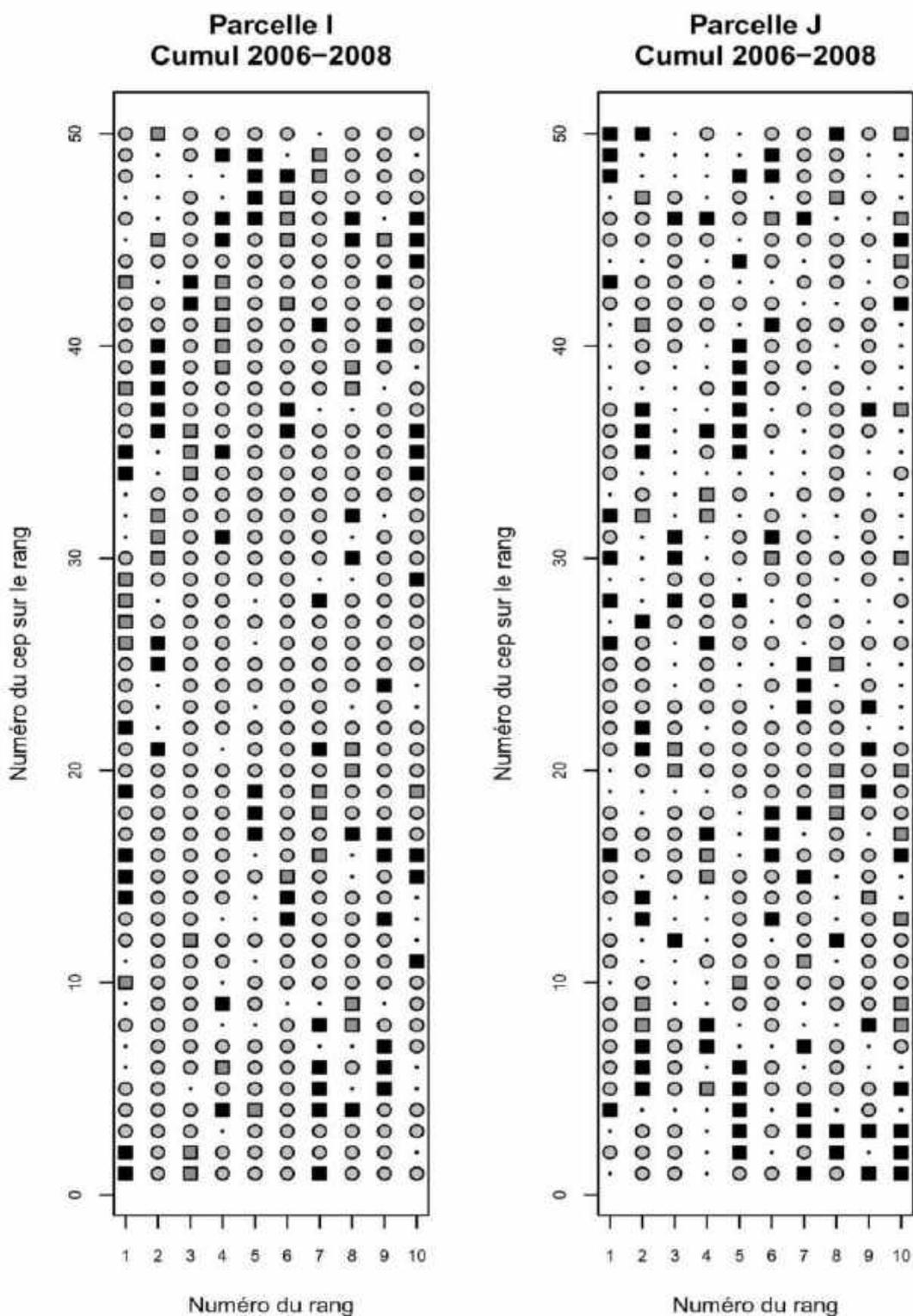


Fig. 25 : Cartographies du cumul 2006, 2007 et 2008 des parcelles CHI et CHJ (les points représentent les manquants ou morts, cercle gris: les ceps sains, carré noir: eutypiose (cumul bras mort et symptômes), carré gris: esca).

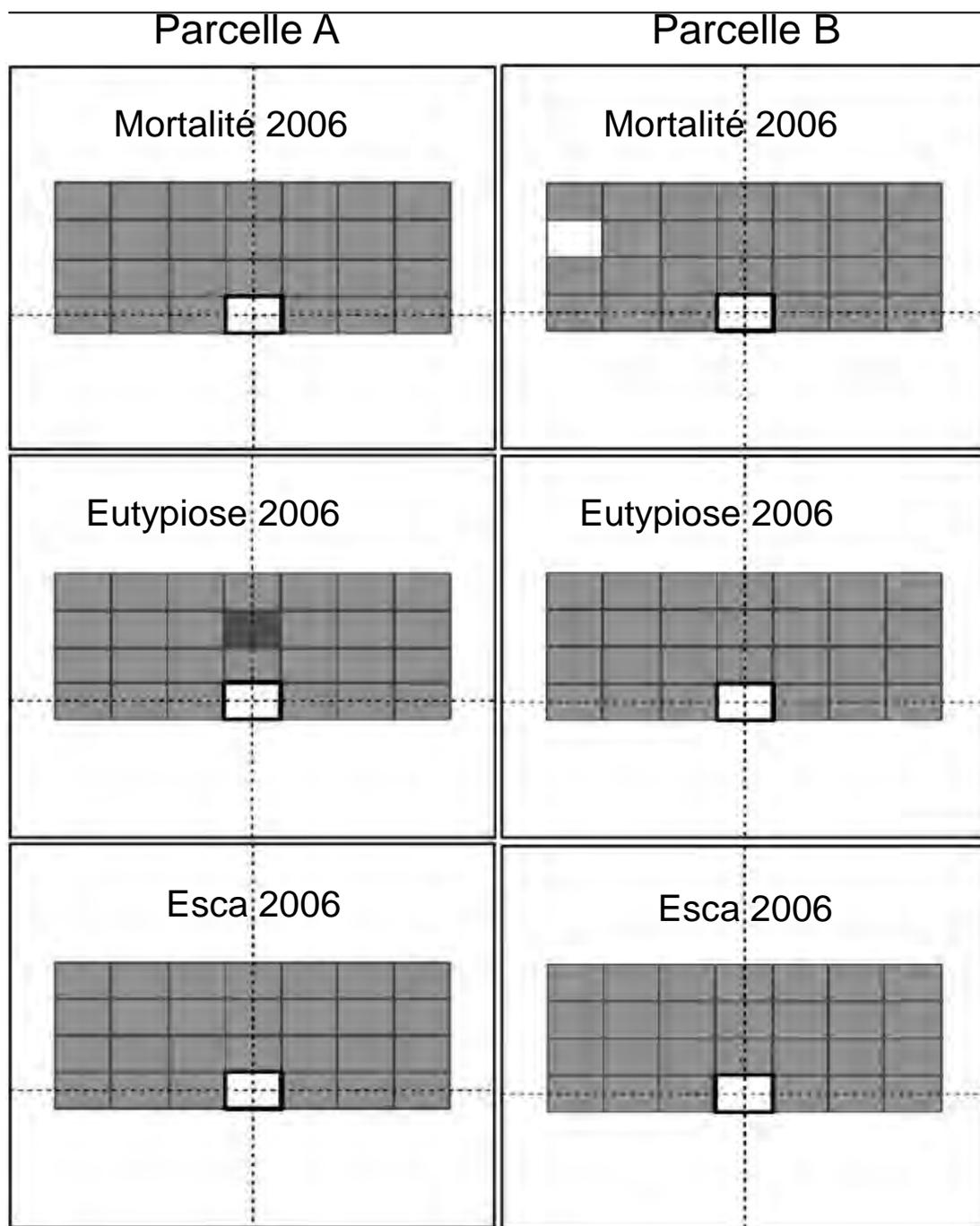
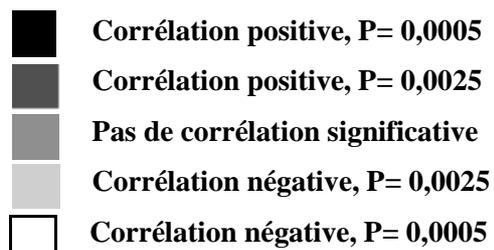


Fig. 26: Analyse statistique de la dépendance spatiale entre ceps pour la mortalité et l'expression des symptômes d'eutypiose et d'esca dans deux parcelles observées uniquement en 2006. Chaque rectangle représente une classe de distance entre deux ceps. Seules les distances proches sont représentées sur la figure.



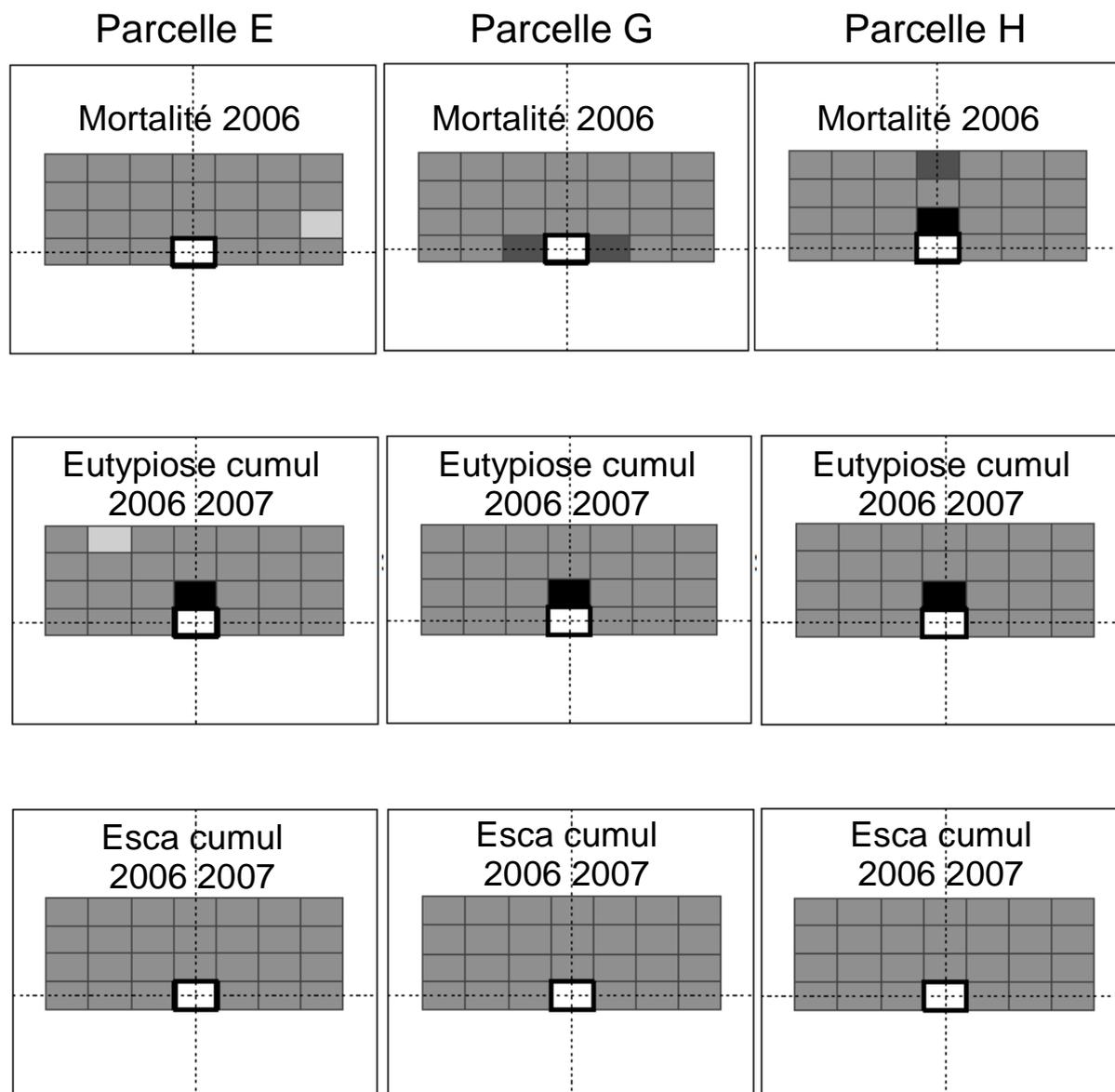
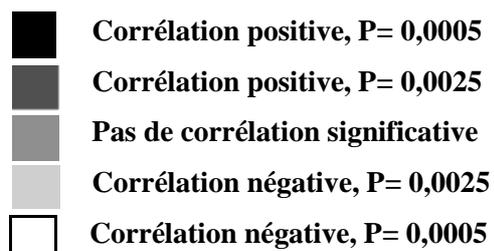


Fig. 27 : Analyse statistique de la dépendance spatiale entre ceps pour la mortalité et l'expression des symptômes d'eutypiose et d'esca dans trois parcelles observées en 2006 et en 2007. La mortalité est étudiée en 2006, pour les symptômes de maladie les observations sont cumulées pour les deux années. Chaque rectangle représente une classe de distance entre deux ceps. Seules les distances proches sont représentées sur la figure.



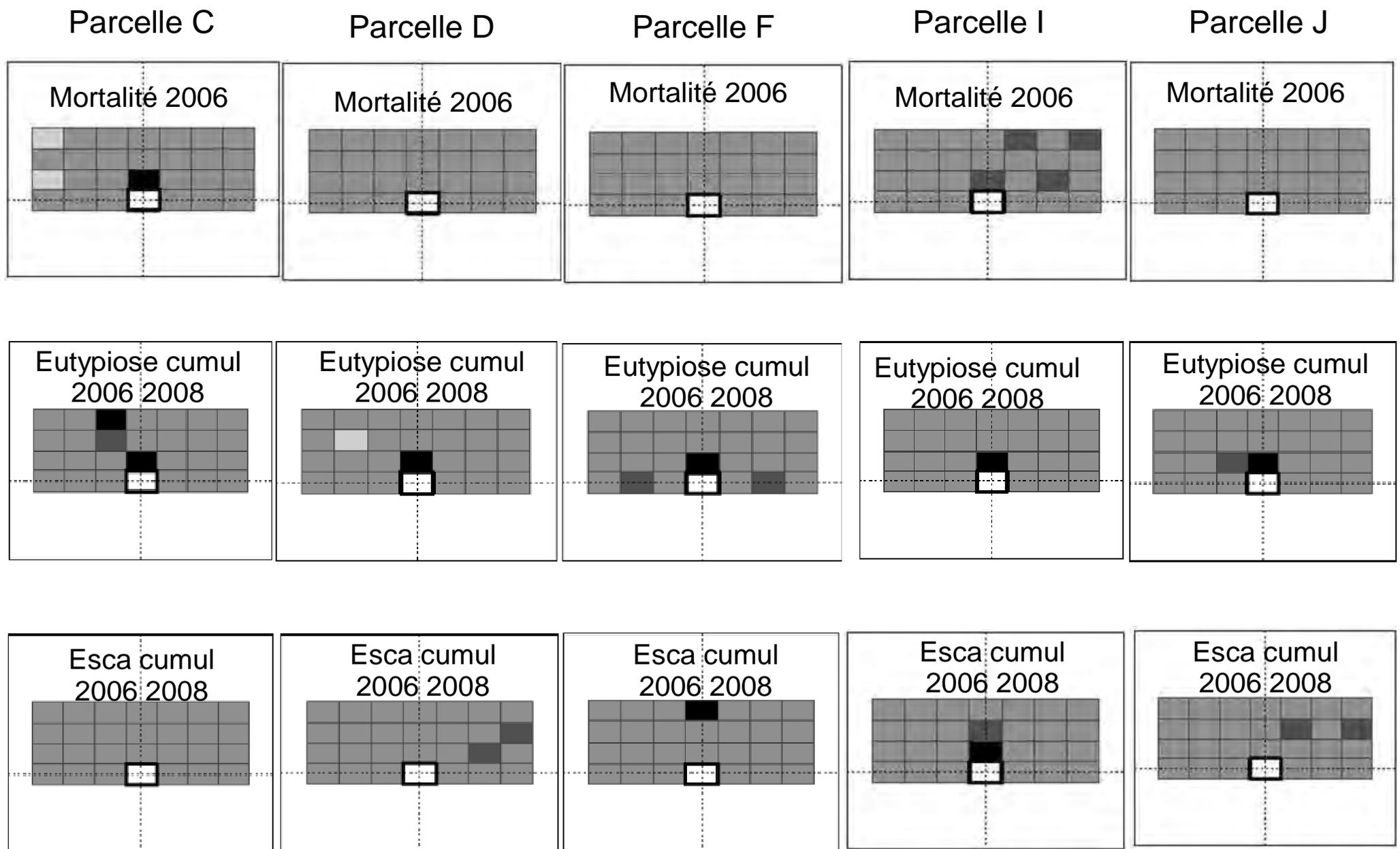


Fig. 28 Analyse statistique de la dépendance spatiale entre ceps pour la mortalité et l'expression des symptômes d'eutypiose et d'esca dans cinq parcelles observées trois années (2006, 2007 et 2008). La mortalité est étudiée en 2006 et pour les symptômes de maladie les observations sont cumulées pour les trois années. Chaque rectangle représente une classe de distance entre deux ceps. Seules les distances proches sont représentées sur la

II. IDENTIFICATION DES AGENTS FONGIQUES IMPLIQUES DANS LE DEPERISSEMENT DE LA VIGNE

8. Description des symptômes internes du bois des ceps

L'analyse des 200 ceps dépérissants (100 ceps avec des symptômes d'esca sous ses deux formes et 100 ceps présentant des symptômes d'eutypiose) prélevés pour réaliser les isolements, ont révélé l'existence de plusieurs types de nécroses dans les troncs et les bras.

Nécrose A : Nécrose brune et dure en position centrale, composée d'une zone brune à consistance dure, entourée par le bois sain qui est parfois parsemé de ponctuations de couleur noire (Fig. 29 a).

Nécrose B : Nécrose brune et dure en position sectorielle, elle se caractérise par une couleur brun foncé et une consistance dure. Elle est caractéristique de l'eutypiose (Fig. 29 b).

Nécrose C : Nécrose claire et tendre en position sectorielle, composée de deux zones, une zone claire (jaune) à consistance tendre semblable à l'amadou, entourée par le bois sain (Fig. 29 c).

Nécrose D : Nécrose claire et tendre en position centrale, composée de trois zones. En position centrale, le bois est de consistance tendre, de couleur claire et friable. Cette zone cariée est délimitée par un fin liseré de couleur brun foncé à consistance dure et du bois sain présentant des ponctuations (Fig. 29 d).

Ponctuations noires PN : Des ponctuations de couleur noire dispersées dans le bois sain autour des nécroses (Fig. 29i).

Il est à signaler que plusieurs types de nécroses peuvent exister sur une même coupe transversale ou sur l'ensemble des coupes réalisées pour un même cep (Fig. 29 e,f,g).

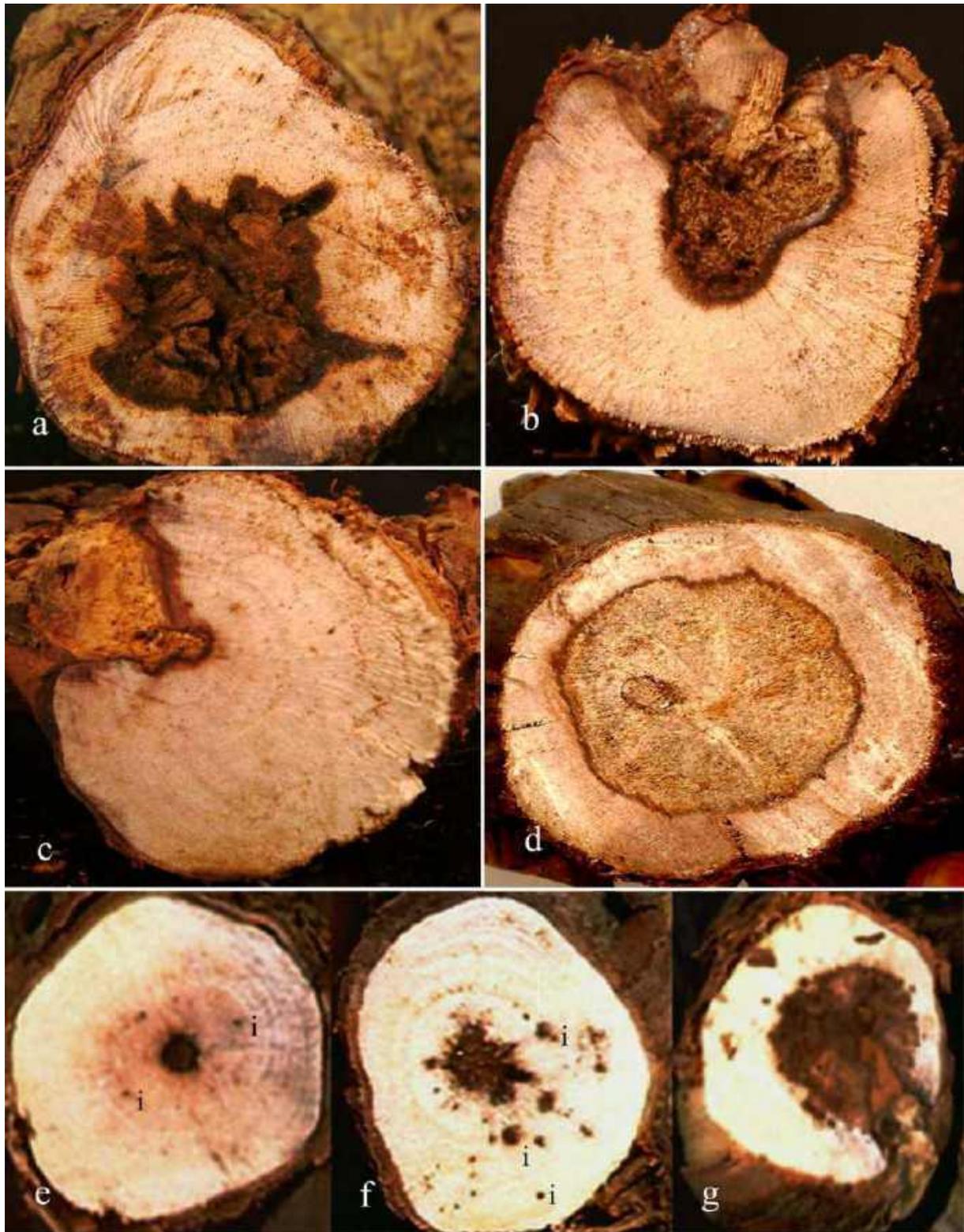


Fig. 29 a : Nécrose brune et dure en position centrale ; b : Nécrose brune et dure en position sectorielle caractéristique de l'eutypiose ; c : Nécrose claire et tendre délimitée par un liseré en position sectorielle d : Nécrose centrale de couleur claire bordée par un liseré ; e,f,g : Coupes transversales dans un tronc montrant la succession des nécroses ; i : Ponctuations noires au niveau du bois sain.

8.1. Localisation des nécroses au niveau du cep en relation avec les symptômes des parties herbacées

Le tableau 25 montre la localisation des différentes nécroses dans le cep où quelque soit leur type, les nécroses sont maximales au niveau du tronc. De l'ensemble des ceps échantillonnés, 97,5% présentaient des nécroses au niveau du tronc, dont le pourcentage est aussi élevé pour les ceps présentant les symptômes externes de l'eutypiose que ceux de l'esca. Les nécroses au niveau des bras n'ont représenté que seulement 10,5% de l'ensemble des ceps échantillonnés.

Tableau 25: Pourcentage de ceps examinés par symptômes au niveau de la végétation en relation avec les nécroses observées dans le tronc et les bras (%).

Nécroses	Eutypiose (n=100)	Esca (n=100)	Total % (n=200)
Tronc	97	98	97,5
Bras	17	4	10,5
Total	114	102	

8.2. Types de nécroses du bois en relation avec les symptômes des parties herbacées

Tous les ceps sont porteurs de nécroses typiques des agents de l'eutypiose et de l'esca. Différentes nécroses ont été trouvées au niveau des ceps analysés (Tabl. 26). Parmi l'ensemble des échantillons prélevés, la nécrose brune et dure en position sectorielle est le symptôme vasculaire le plus rencontré avec 59,5%. La nécrose claire et tendre en position sectorielle (C) et les ponctuations noires sont rencontrées dans 18% et 17,5% des ceps observés. La nécrose en position centrale, qu'elle soit brune et dure (A) ou claire et tendre (D), n'a été rencontrée que dans 12,5% et 2,5% des ceps examinés.

Tableau 26: Pourcentage de ceps examinés par symptômes au niveau de la végétation en relation avec les nécroses observées dans le bois (%).

Nécroses	Eutypiose (n=100)	Esca (n=100)	Total % (n=200)
A	22	3	12,5
B	61	58	59,5
C	21	14	17,5
D	5	0	2,5
PN	8	28	18

n : Nombre de ceps analysés ; **A** : Nécrose brune et dure en position centrale ; **B** : Nécrose brune et dure en position sectorielle ; **C** : Nécrose claire et tendre en position sectorielle **D** : Nécrose claire et tendre en position centrale ; **PN** : Ponctuations noires.

Quant à la relation des symptômes externes des ceps examinés (parties herbacées) avec les différentes nécroses retrouvées dans le bois, nous constatons que toutes les nécroses sont présentes au sein des ceps qui montrent les symptômes des deux maladies, excepté la nécrose

claire et tendre en position centrale (D) qui est absente chez les ceps qui manifestent les symptômes d'esca. Chez les ceps qui manifestent des symptômes, au niveau de la partie herbacée caractéristique de l'eutypiose, la nécrose la plus rencontrée est la nécrose brune et dure en position sectorielle (B). Les ceps qui manifestent des symptômes d'esca, présentent également la nécrose B dans 61% et 58% des cas, respectivement.

9. Agents pathogènes impliqués dans l'esca et l'eutypiose

De nombreux micro-organismes sont isolés à partir des 3900 bûchettes découpées dans les différentes zones des nécroses. Les caractères phénotypiques basés sur la morphologie des colonies tels que l'aspect général du mycélium, sa couleur sa croissance ainsi que les fructifications (Tabl. 5); nous ont permis de différencier quatre genres et une famille. Les tableaux 28, 29, 30, 31 et 32 présentent les différents isolats de l'étude, leur origine géographique ainsi que les symptômes à partir desquels ils ont été isolés. A coté de ces agents fongiques, nous avons isolé, à de faible fréquence, d'autres micro-organismes. Parmi les genres les plus rencontrés, citons : *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Verticillium*, ainsi que des bactéries qui ont été considérés comme des saprophytes et ne figurent donc pas dans les analyses ultérieures.

9.1.Fréquences d'isolement des agents fongiques

Les agents pathogènes isolés à partir des différentes lésions vasculaires sont par ordre d'importance, *Phaeomoniella* spp.avec une fréquence d'isolement de 60%, suivie des espèces de la famille des *Botryosphaeriaceae* avec 52%. *Phaeoacremonium* spp.et *Eutypa* spp. ont été isolées avec des fréquences respectives de 30,5% et 30%. Enfin, *Fomitiporia* spp.ont été faiblement isolées, avec une fréquence de 11,5%. Il convient de noter que la fréquence totale d'isolement est supérieure à 100%, dû au fait qu'à partir d'une seule bûchette plusieurs agents peuvent être isolés en même temps.

Tableau 27 : Nombre et fréquence des agents fongiques isolés

Agent fongique	Nombre d'isolats	Fréquence d'isolement %
<i>Phaeomoniella</i> spp.	120	60
<i>Botryosphaeriaceae</i>	104	52
<i>Phaeoacremonium</i> spp.	61	30,5
<i>Eutypa</i> spp.	60	30
<i>Fomitiporia</i> spp.	23	11,5

Tableau 28: Origines, codes et identification des *Phaeoacremonium* spp.

Parcelles	Symptômes du cep	Code des isolats	Extraction d'ADN	MSP-PCR	Amplification T1/Bt2B	Amplification Act512F/Act-783R	Séquençage	Identification des <i>Phaeoacremonium</i> spp.
CHD	Eutypiose	P1	1	1	1	1	1	<i>Phaeoacremonium venezuelense</i>
CHD	Eutypiose	P2	1	0				<i>Phaeoacremonium venezuelense</i>
CHD	Eutypiose	P3	1	1				<i>Phaeoacremonium venezuelense</i>
CHD	Esca	P4	1	1	1	1	1	<i>Phaeoacremonium venezuelense</i>
CHD	Eutypiose	P5	1	1				<i>Phaeoacremonium venezuelense</i>
CHD	Eutypiose	P6	1	1				<i>Phaeoacremonium venezuelense</i>
CHA	Eutypiose	P7	1	1				<i>Phaeoacremonium venezuelense</i>
CHB	Esca	P8	1	1	1	1	1	<i>Phaeoacremonium venezuelense</i>
CHC	Eutypiose	P9	1	1				<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>
CHE	Eutypiose	P10	1	1				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHJ	Esca	P11	1	1				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHB	Esca	P12	1	1	1	1	1	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHD	Esca	P13	1	1				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHH	Eutypiose	P14	1	1	1	1	1	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHB	Esca	P15	1	1				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHJ	Esca	P16	1	1	1	1	1	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHB	Eutypiose	P17	1	1				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHF	Eutypiose	P18	1	1				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHC	Esca	P19	1	1				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHC	Eutypiose	P20	1	1				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHJ	Eutypiose	P21	1	1				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHJ	Esca	P22	1	1	1	1	1	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHJ	Eutypiose	P23	1	1				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHD	Esca	P24	1	1				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHD	Esca	P25	1	1				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHD	Eutypiose	P26	1	1				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHB	Eutypiose	P27	1	0				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHE	Eutypiose	P28	1	1	1	1	1	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHH	Eutypiose	P29	1	1	1	1	1	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHH	Eutypiose	P30	1	1	1	1	1	<i>Phaeoacremonium hispanicum</i>
CHG	Esca	P31	1	1				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHC	Eutypiose	P32	1	1				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHF	Esca	P33	1	1	1			<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHJ	Eutypiose	P34	1	0				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHI	Eutypiose	P35	1	1	1			<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHI	Eutypiose	P36	1	1				<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>
CHI	Eutypiose	P37	1	1	1	1	1	<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>
CHF	Esca	P38	1	1				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHF	Esca	P39	1	1	1	1	1	<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>
CHF	Eutypiose	P40	1	1				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHG	Eutypiose	P41	1	1				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHG	Eutypiose	P42	1	0				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHJ	Eutypiose	P43	1	0				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHJ	Eutypiose	P44	1	1				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHA	Esca	P45	1	1				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHC	Esca	P46	1	1	1	1	1	<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>
CHC	Eutypiose	P47	1	1	1			<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHA	Eutypiose	P48	1	1				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHB	Eutypiose	P49	1	1	1	1	1	<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHB	Eutypiose	P50	1	0				<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>
CHH	Esca	P51	1	0				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHG	Eutypiose	P52	1	0				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHG	Esca	P53	1	0				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHG	Esca	P54	1	0				<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>
CHC	Eutypiose	P55	1	0				Non identifié
CHE	Esca	P56	1	1	1	1	1	<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>
CHE	Eutypiose	P57	1	0				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHI	Esca	P58	1	1				<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>

CHAPITRE III : RESULTATS

CHJ	Esca	P59	1	0					<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHB	Eutypiose	P60	1	1					<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
CHH	Eutypiose	P61	1	1					<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>
CHB	Esca	P62	1	1		1	1	1	<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>

Tableau 29: Origines, codes et identification des *Botryosphaeriaceae*

Parcelles	Symptômes du cep	Code des isolats	Extraction d'ADN	MSP-PCR	Amplification ITS1/ITS4	Amplification EF1- α	Séquençage	Identification des <i>Botryosphaeriaceae</i>
CHC	Esca	B1	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHJ	Esca	B2	1	0				Non identifié
CHB	Eutypiose	B3	1	1	1	1	1	<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHC	Esca	B4	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHB	Esca	B5	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHJ	Esca	B6	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHF	Esca	B7	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHE	Esca	B8	1	1	1	1	1	<i>Diplodia seriata</i>
CHJ	Eutypiose	B9	1	1	1	1	1	<i>Lasiodiplodia spp</i>
CHB	Eutypiose	B10	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHI	Eutypiose	B11	1	1	1	0	1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>
CHB	Eutypiose	B12	1	1	1	1	1	<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHJ	Eutypiose	B13	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHB	Eutypiose	B14	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHB	Eutypiose	B15	1	1	1	1	1	<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHJ	Esca	B16	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHC	Eutypiose	B17	1	1	1	1	1	<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHC	Eutypiose	B18	1	1	1	1	1	<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHC	Eutypiose	B19	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHE	Eutypiose	B20	1	1				Non identifié
CHF	Eutypiose	B21	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHI	Eutypiose	B22	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHI	Eutypiose	B23	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHH	Esca	B24	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHG	Eutypiose	B25	1	1	1	1	1	<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHB	Esca	B26	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHJ	Esca	B27	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHE	Eutypiose	B28	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHJ	Eutypiose	B29	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHE	Eutypiose	B30	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHE	Eutypiose	B31	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHB	Esca	B32	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHH	Esca	B33	1	1	1	1	1	<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHB	Eutypiose	B34	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHC	Esca	B35	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHJ	Esca	B36	1	1	1	0	1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>
CHD	Eutypiose	B37	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHJ	Eutypiose	B38	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHF	Eutypiose	B39	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHG	Esca	B40	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHE	Esca	B41	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHF	Eutypiose	B42	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHF	Esca	B43	1	1	1	1	1	<i>Botryosphaeria dothidea</i>
CHG	Eutypiose	B44	1	1	1	1	1	<i>Neofusicoccum australe</i>
CHB	Esca	B45	1	1	1	1	1	<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHC	Esca	B46	1	1	1	1	1	<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHI	Esca	B47	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHA	Eutypiose	B48	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHA	Eutypiose	B49	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHH	Esca	B50	1	1	1	1	1	<i>Diplodia seriata</i>

CHAPITRE III : RESULTATS

Parcelles	Symptômes du cep	Code des isolats	Extraction d'ADN	MSP-PCR	Amplification ITS1/ITS4	Amplification EF1- α	Séquençage	Identification des <i>Botryosphaeriaceae</i>
CHE	Esca	B51	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHG	Eutypiose	B52	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHG	Esca	B53	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHG	Esca	B54	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHB	Esca	B55	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHJ	Eutypiose	B56	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CGC	Eutypiose	B57	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHA	Esca	B58	1	0				Non identifié
CHD	Esca	B59	1	0				Non identifié
CHB	Eutypiose	B60	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHC	Esca	B61	1	1	1	1	1	<i>Diplodia seriata</i>
CHA	Esca	B62	1	1	1	1	1	<i>Diplodia seriata</i>
CHE	Esca	B63	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHJ	Eutypiose	B64	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHE	Eutypiose	B65	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHB	Eutypiose	B66	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHD	Eutypiose	B68	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHB	Esca	B69	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHC	Esca	B70	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHE	Eutypiose	B71	1	1				<i>Botryosphaeria dothidea</i>
CHG	Eutypiose	B72	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHG	Esca	B73	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHE	Eutypiose	B74	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHJ	Eutypiose	B75	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHI	Eutypiose	B76	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHC	Esca	B77	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHE	Esca	B78	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHC	Esca	B79	1	1	1	1	1	<i>Diplodia seriata</i>
CHC	Eutypiose	B80	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHG	Esca	B81	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHE	Eutypiose	B82	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHE	Eutypiose	B83	1	1	1	1	1	<i>Diplodia seriata</i>
CHG	Esca	B84	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHG	Eutypiose	B85	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHI	Eutypiose	B86	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHF	Eutypiose	B87	1	0				Non identifié
CHG	Eutypiose	B88	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHG	Eutypiose	B89	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHD	Eutypiose	B90	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHB	Esca	B91	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHE	Eutypiose	B92	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHE	Eutypiose	B93	1	1	1	1	1	<i>Neof. Mediterraneum</i>
CHB	Eutypiose	B94	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHE	Eutypiose	B95	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHG	Esca	B96	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHI	Eutypiose	B97	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHI	Eutypiose	B98	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHI	Esca	B99	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHB	Esca	B100	1	1	1	1	1	<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHB	Eutypiose	B101	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHB	Esca	B102	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHG	Eutypiose	B103	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHD	Eutypiose	B104	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHJ	Eutypiose	B105	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHG	Eutypiose	B106	1	1				<i>Neofusicoccum parvum</i>
CHJ	Eutypiose	B107	1	1				<i>Botryosphaeria dothidea</i>
CHB	Esca	B108	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHJ	Esca	B109	1	1				<i>Diplodia seriata</i>
CHC	Eutypiose	B110	1	1	1	1	1	<i>Neofusicoccum parvum</i>

Tableau 30 : Origines, codes et identification de *Phaeomoniella* spp.

Parcelles	Symptômes du cep	Code des isolats	Extraction d'ADN	MSP-PCR	Amplification des ITS	Séquençage	Identification des <i>Phaeomoniella</i> spp.
CHC	Eutypiose	A1	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHI	Eutypiose	A2	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHI	Eutypiose	A3	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHC	Eutypiose	A4	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHA	Eutypiose	A5	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHE	Eutypiose	A6	1	1	1	1	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHE	Esca	A7	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHH	Eutypiose	A8	1	1	1	1	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHG	Eutypiose	A9	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHJ	Esca	A10	1	1	1	1	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHD	Eutypiose	A11	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHH	Esca	A12	1	1	1	1	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHB	Eutypiose	A13	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHJ	Eutypiose	A14	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHJ	Esca	A15	1	1	1	1	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHJ	Eutypiose	A16	1	1	1	1	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHH	Eutypiose	A17	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHH	Eutypiose	A18	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHF	Eutypiose	A19	1	1	1	1	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHF	Esca	A20	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHC	Eutypiose	A21	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHE	Eutypiose	A22	1	1	1	1	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHE	Eutypiose	A23	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHB	Eutypiose	A24	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHB	Eutypiose	A25	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHI	Esca	A26	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHI	Eutypiose	A27	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHI	Eutypiose	A28	1	1	1	1	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHI	Eutypiose	A29	1	1	1	1	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHI	Eutypiose	A30	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHI	Eutypiose	A31	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHI	Esca	A32	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHD	Eutypiose	A33	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHC	Eutypiose	A34	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHC	Esca	A35	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHC	Eutypiose	A36	1	1	1	1	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHG	Eutypiose	A37	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHG	Eutypiose	A38	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHG	Eutypiose	A39	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHG	Eutypiose	A40	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHE	Esca	A41	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHE	Esca	A42	1	1	1	1	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHE	Esca	A43	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHE	Esca	A44	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHJ	Eutypiose	A45	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHJ	Eutypiose	A46	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHJ	Eutypiose	A47	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHA	Eutypiose	A48	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHA	Eutypiose	A49	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHF	Eutypiose	A50	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHF	Esca	A51	1	1	1	1	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHF	Esca	A52	1	1	1	1	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHB	Esca	A53	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHB	Esca	A54	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHB	Esca	A55	1	1	1	1	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHB	Eutypiose	A56	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHH	Esca	A57	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHH	Eutypiose	A58	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHA	Esca	A59	1	1	1	1	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHA	Eutypiose	A60	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>

CHAPITRE III : RESULTATS

CHA	Eutypiose	A61	1	1	1	1	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHA	Eutypiose	A62	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHH	Esca	A63	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHB	Esca	A64	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHB	Eutypiose	A65	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHB	Eutypiose	A66	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHB	Eutypiose	A67	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHB	Esca	A68	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHJ	Esca	A69	1	1	1	1	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHJ	Esca	A70	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHG	Esca	A71	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHG	Esca	A72	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHG	Esca	A73	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHG	Eutypiose	A74	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHH	Esca	A75	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHH	Eutypiose	A76	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHC	Eutypiose	A77	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHD	Eutypiose	A78	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHD	Eutypiose	A79	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHD	Eutypiose	A80	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHE	Esca	A81	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHF	Esca	A82	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHF	Eutypiose	A83	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHI	Eutypiose	A84	1	1			<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
CHA	Eutypiose	A85	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHA	Eutypiose	A86	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHC	Eutypiose	A87	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHC	Eutypiose	A88	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHC	Eutypiose	A89	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHE	Eutypiose	A90	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHE	Eutypiose	A91	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHF	Eutypiose	A92	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHF	Eutypiose	A93	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHF	Eutypiose	A94	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHF	Eutypiose	A95	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHF	Eutypiose	A96	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHF	Eutypiose	A97	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHG	Eutypiose	A98	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHG	Eutypiose	A99	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHG	Eutypiose	A100	0	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHG	Eutypiose	A101	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHH	Eutypiose	A102	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHJ	Eutypiose	A103	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHJ	Eutypiose	A104	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHA	Esca	A105	0	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHA	Esca	A106	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHA	Esca	A107	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHA	Esca	A108	0	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHB	Esca	A109	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHC	Esca	A110	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHC	Esca	A111	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHD	Esca	A112	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHE	Esca	A113	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHF	Esca	A114	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHG	Esca	A115	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHG	Esca	A116	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHI	Esca	A117	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHJ	Esca	A118	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHD	Esca	A119	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.
CHC	Esca	A120	1	0			<i>Phaeomoniella</i> spp.

Tableau 31: Origines, codes et identification d'*Eutypa* spp.

Parcelles	Symptômes du cep	Code des isolats	Extraction d'ADN	MSP-PCR	Amplification des ITS	Séquençage	Identification des <i>Eutypa</i> spp.
CHG	Eutypiose	E1	1	1	1	1	<i>Eutypa lata</i>
CHC	Eutypiose	E2	1	0			<i>Eutypa</i> spp.
CHB	Eutypiose	E3	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHI	Esca	E4	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHF	Eutypiose	E5	1	1	1	1	contamination
CHG	Eutypiose	E6	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHI	Eutypiose	E7	1	1	1	1	<i>Eutypa lata</i>
CHG	Eutypiose	E8	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHE	Eutypiose	E9	1	1	1	1	<i>Eutypa lata</i>
CHI	Esca	E10	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHB	Eutypiose	E11	1	1	1	1	<i>Eutypa lata</i>
CHF	Eutypiose	E12	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHA	Eutypiose	E13	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHA	Esca	E14	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHB	Esca	E15	1	1	1	1	<i>Eutypa lata</i>
CHB	Esca	E16	1	1	1	1	<i>Eutypa lata</i>
CHH	Esca	E17	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHH	Eutypiose	E18	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHH	Esca	E19	1	1	1	1	contamination
CHG	Esca	E20	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHG	Eutypiose	E21	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHG	Eutypiose	E22	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHJ	Eutypiose	E23	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHF	Esca	E24	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHC	Esca	E25	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHA	Eutypiose	E26	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHE	Eutypiose	E27	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHG	Esca	E28	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHF	Eutypiose	E29	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHA	Eutypiose	E30	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHA	Eutypiose	E31	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHF	Eutypiose	E32	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHF	Esca	E33	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHF	Eutypiose	E34	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHB	Esca	E35	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHB	Esca	E36	1	1	1	1	<i>Eutypa lata</i>
CHH	Esca	E37	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHG	Eutypiose	E38	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHG	Esca	E39	1	1	1	1	<i>Eutypa lata</i>
CHG	Eutypiose	E40	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHG	Eutypiose	E41	1	1	1	1	<i>Eutypa lata</i>
CHC	Esca	E42	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHI	Esca	E43	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHI	Eutypiose	E44	1	1	1	1	<i>Eutypa lata</i>
CHJ	Eutypiose	E45	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHD	Esca	E46	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHG	Eutypiose	E47	1	0			<i>Eutypa</i> spp.
CHJ	Esca	E48	1	1			<i>Eutypa lata</i>
CHC	Eutypiose	E49	1	0			<i>Eutypa</i> spp.
CHD	Eutypiose	E50	1	0			<i>Eutypa</i> spp.
CHD	Eutypiose	E51	1	0			<i>Eutypa</i> spp.
CHD	Eutypiose	E52	1	0			<i>Eutypa</i> spp.
CHE	Eutypiose	E53	1	0			<i>Eutypa</i> spp.
CHI	Eutypiose	E54	1	0			<i>Eutypa</i> spp.
CHJ	Eutypiose	E55	1	0			<i>Eutypa</i> spp.
CHC	Esca	E56	1	0			<i>Eutypa</i> spp.
CHE	Esca	E57	1	0			<i>Eutypa</i> spp.
CHF	Esca	E58	1	0			<i>Eutypa</i> spp.
CHG	Esca	E59	1	0			<i>Eutypa</i> spp.
CHH	Esca	E60	1	0			<i>Eutypa</i> spp.

Tableau 32 : Origines, codes et identification des *Fomitiporia* spp.

Parcelles	Symptômes du cep	Code des isolats	Extraction d'ADN	MSP-PCR	Amplification des ITS	Séquençage	Identification des <i>Fomitiporia</i> spp.
CHC	Eutypiose	F1	1	1			<i>Fomitiporia mediterranea</i>
CHC	Esca	F2	1	1	1	1	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
CHC	Eutypiose	F3	1	1			<i>Fomitiporia mediterranea</i>
CHC	Eutypiose	F4	1	1	1	1	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
CHF	Eutypiose	F5	1	1	1	0	<i>Fomitiporia</i> spp.
CHE	Esca	F6	1	1			<i>Fomitiporia mediterranea</i>
CHI	Esca	F7	1	1	1	1	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
CHI	Eutypiose	F8	1	1			<i>Fomitiporia mediterranea</i>
CHD	Eutypiose	F9	1	1	1	1	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
CHJ	Eutypiose	F10	1	1	1	1	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
CHJ	Esca	F11	1	1	1	1	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
CHC	Eutypiose	F12	1	1	1	1	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
CHA	Eutypiose	F13	1	1	1	1	<i>Fomitiporella</i> spp.
CHG	Eutypiose	F14	1	1			<i>Fomitiporia mediterranea</i>
CHJ	Esca	F15	1	1			<i>Fomitiporia mediterranea</i>
CHF	Eutypiose	F16	1	1	1	1	<i>Phellinus mori</i>
CHH	Eutypiose	F17	1	1			<i>Fomitiporia mediterranea</i>
CHG	Esca	F18	1	1	1	1	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
CHC	Eutypiose	F19	1	0			<i>Fomitiporia</i> spp.
CHF	Eutypiose	F20	1	0			<i>Fomitiporia</i> spp.
CHI	Eutypiose	F21	1	0			<i>Fomitiporia</i> spp.
CHC	Esca	F22	1	0			<i>Fomitiporia</i> spp.
CHJ	Esca	F23	1	0			<i>Fomitiporia</i> spp.

9.2. Localisation des différents agents fongiques au niveau des ceps

Les 368 isolats ont été obtenus à partir des cinq types de nécroses associées aux ceps qui présentaient les symptômes d'eutypiose et d'esca (Tabl. 33). Le nombre d'isolats trouvé dans les ceps qui montraient les symptômes d'eutypiose (221) est plus important que celui des ceps qui exhibaient les symptômes typiques de l'esca (147).

En ce qui concerne la localisation dans les ceps, il a été constaté que les champignons ont été beaucoup plus fréquemment isolés à partir du tronc (337) qu'au niveau des bras (31).

Quant à la relation des types de nécroses trouvées dans les ceps avec les différents isolats, nous avons constaté que les champignons ont été plus particulièrement isolés de la nécrose brune et dure en position sectorielle (B) avec 179 isolats parmi les 368, suivi par la nécrose claire et tendre mais toujours en position sectorielle (C) avec 80 isolats, 41 isolats ont été obtenus à partir des ponctuations noires (NP) ; 40 isolats à partir de la nécrose brune et dure

en position centrale (A) et seulement 28 isolats à partir de la nécrose claire et tendre en position centrale (D).

Nous constatons que *Phaeomoniella* spp. ont été isolées à partir de toutes les nécroses, plus particulièrement de la nécrose sectorielle et des ponctuations situées à la périphérie des nécroses (PN). Elles ont été très peu isolées de la nécrose claire et tendre en position centrale. Les *Botryosphaeriaceae* ont été surtout isolées à partir des nécroses sectorielles (B et C) et très peu rencontrées au niveau des nécroses centrales (A et D) et des ponctuations (PN). *Phaeoacremonium* spp. proviennent surtout de la nécrose brune et dure en position sectorielle (B), mais elles ont été isolées à de faibles fréquences à partir de toutes les autres lésions. *Eutypa* spp. ont été également associées à la nécrose brune et dure en position sectorielle (B) et elles ont été très peu isolées à partir des autres nécroses. Enfin *Fomitiporia* spp. ont été prédominants dans la nécrose claire et tendre, alors qu'elles sont absentes au niveau des ponctuations et rarement isolées des nécroses brunes et dures, qu'elles soient sectorielles ou centrales (Tabl. 33).

Tableau 33: Nombre d'agents fongiques isolés à partir des nécroses des troncs et des bras des ceps dépéris

Partie du cep/ genres	Eutypiose					esca					Total
	A	B	PN	C	D	A	B	PN	C	D	
Troncs											
<i>Phaeomoniella</i> spp.	16	28	4	15	4	1	19	19	6	0	112
<i>Botryosphaeriaceae</i>	4	30	0	18	1	1	18	4	4	15	95
<i>Phaeoacrem.</i> spp.	8	17	1	5	3	1	11	6	5	0	57
<i>Eutypa</i> spp.	6	17	1	4	1	1	19	1	2	0	52
<i>Fomitiporia</i> spp.	1	0	0	8	4	0	1	0	7	0	21
Bras											
<i>Phaeomoniella</i> spp.	0	4	2	1	0	0	0	1	0	0	8
<i>Botryosphaeriaceae</i>	0	5	1	2	0	0	1	0	0	0	9
<i>Phaeoacrem.</i> spp.	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	4
<i>Eutypa</i> spp.	1	4	0	0	0	0	2	1	0	0	8
<i>Fomitiporia</i> spp.	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2
Total	36	108	9	55	13	4	71	32	25	15	368

A : nécrose brune et dure en position centrale ; B : nécrose brune et dure en position sectorielle ; C : nécrose claire et tendre en position sectorielle D : nécrose claire et tendre en position centrale ; PN : ponctuations noires.

3. Identification des *Phaeoacremonium* spp.

3.1. Caractérisation moléculaire des isolats *Phaeoacremonium* spp.

L'étude a porté sur un total de 61 isolats (Tabl. 28) identifiés de manière préliminaire par l'utilisation de méthodes phénotypiques. La caractérisation moléculaire s'est déroulée en deux étapes. Nous avons d'abord réalisé une évaluation du polymorphisme présent au sein des isolats, complétée par un séquençage et une analyse phylogénétique des isolats représentatifs de chaque groupe généré de l'analyse MSP-PCR.

3.1.1. Génotypage des régions microsatellites par MSP-PCR

Le microsatellite M13 a généré diverses et complexes empreintes génomiques, avec plusieurs bandes d'intensités différentes qui varient selon les isolats (Fig. 30). Cependant, certains isolats n'ont pas été clairement discriminés montrant un signal de faible intensité voir absent pour certains. La figure 31 montre le dendrogramme basé sur l'analyse typologique des profils MSP-PCR par la méthode UPGMA. Il met ainsi en évidence 7 groupes significatifs (4 clusters et 3 singletons) avec un niveau de reproductibilité de 70% (Fig.31). Le premier groupe est formé de 7 isolats, dont 5 ont été isolés à partir de ceps eutypifiés et seulement 2 isolats de l'esca. Le groupe 2 est formé par un seul isolat P30, provenant d'un cep eutypifié ; le groupe 3 réunit la plupart des isolats, dont 18 sont isolés à partir de symptômes d'eutypiose et 15 isolats, de l'esca. Le groupe 4 renferme 3 isolats de l'eutypiose et un seul de l'esca. Le groupe 5 comprend 2 isolats provenant des symptômes d'esca. Les groupes 6 et 7 sont formés chacun d'un seul isolat et qui proviennent des symptômes d'esca et d'eutypiose, respectivement. Ainsi, 17 isolats (Fig.31) représentatifs de chaque groupe et lorsque c'était possible, les isolats provenant des symptômes d'eutypiose et d'esca ont été sélectionnés pour les analyses phylogénétiques et morphologiques.

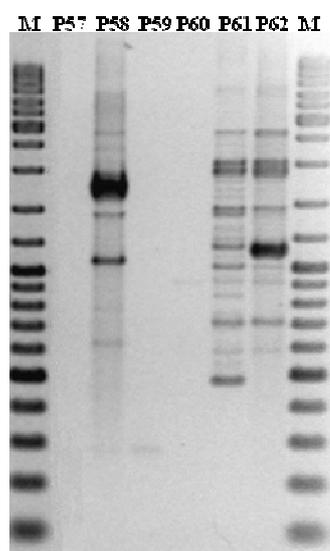
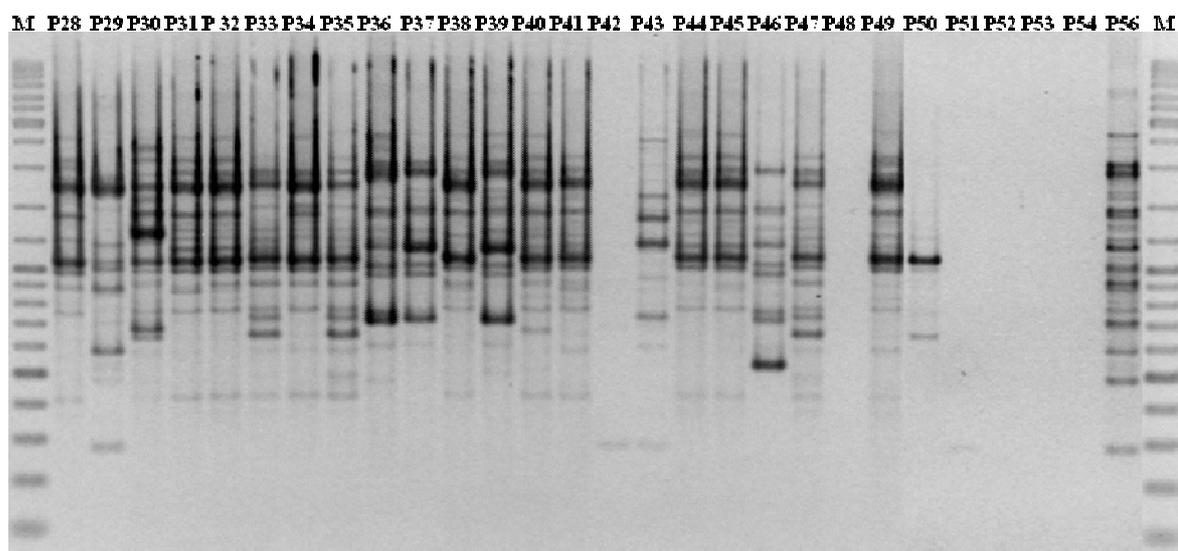
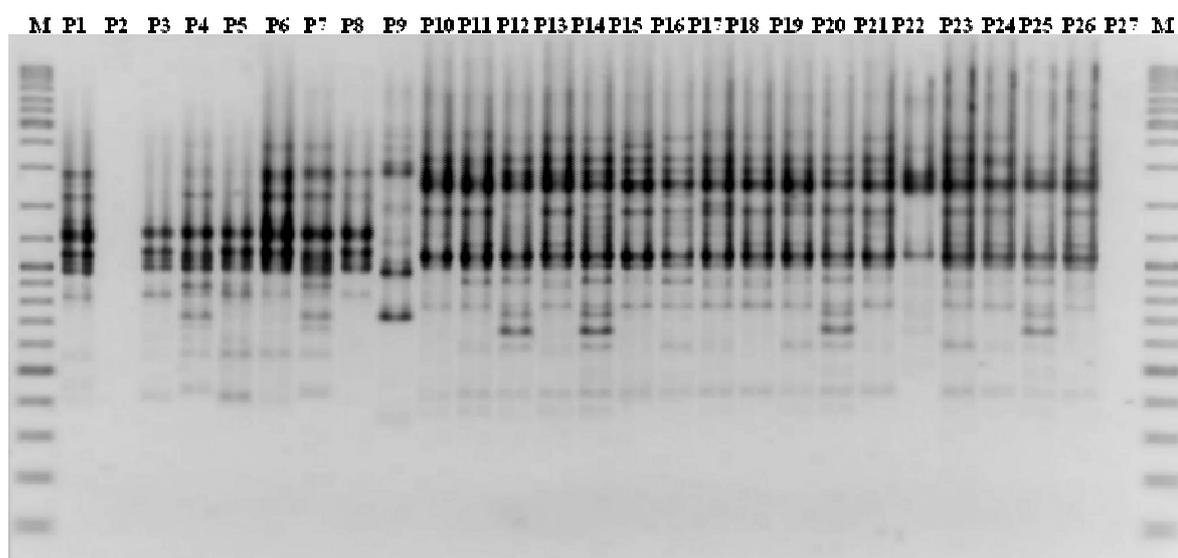


Fig.30: Profiles MSP-PCR des isolats de Phaeoacremonium spp. générés par l'amorce M13 après séparations par électrophorèses dans des gels d'agarose à 1,5%, à 80V pendant 3H30mn.

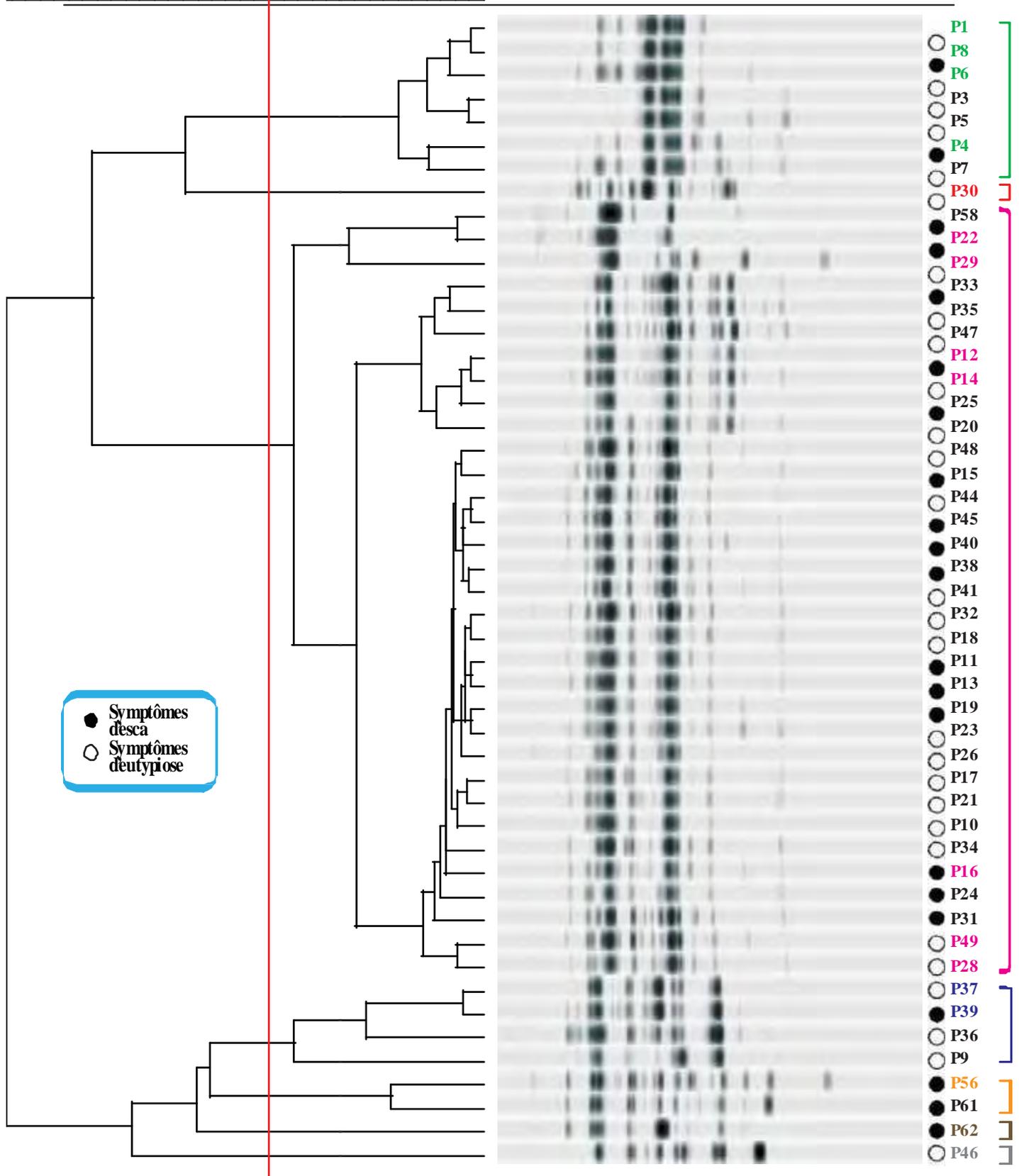
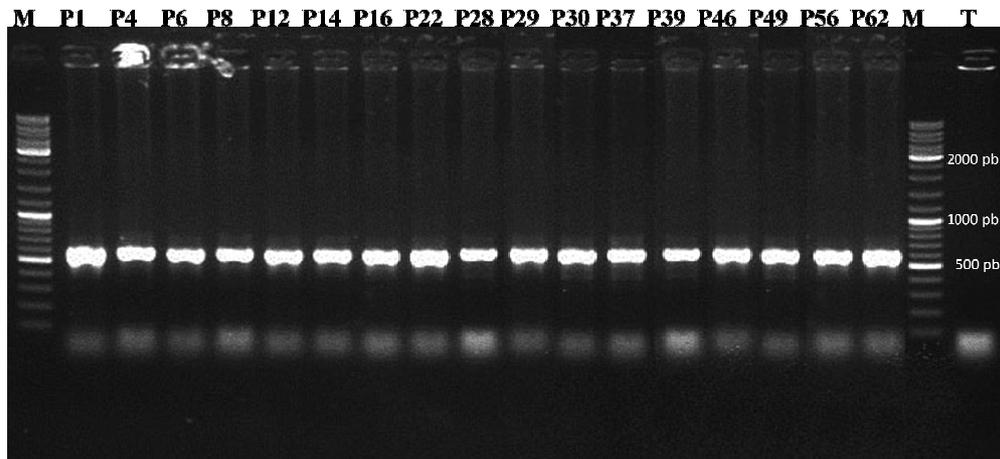


FIG.31: Dendrogramme des profils MSP-PCR obtenus avec l'amorce (M13). La ligne verticale correspond au niveau de reproductibilité (70%) à partir de laquelle 7 groupes d'isolats sont déduits. Dans chaque groupe, les isolats mis en évidence en couleur ont été sélectionnés pour l'analyse phylogénétique. Toutes les empreintes génétiques ont été regroupées par similarité en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson et UPGMA. Les isolats obtenus dans cette étude à partir de vignes avec les symptômes d'eutypiose ou d'esca sont indiqués par des cercles blancs et noirs, respectivement.

3.1.2. Séquençage et analyses phylogénétiques

3.1.2.1. Amplification du gène de la β -tubuline

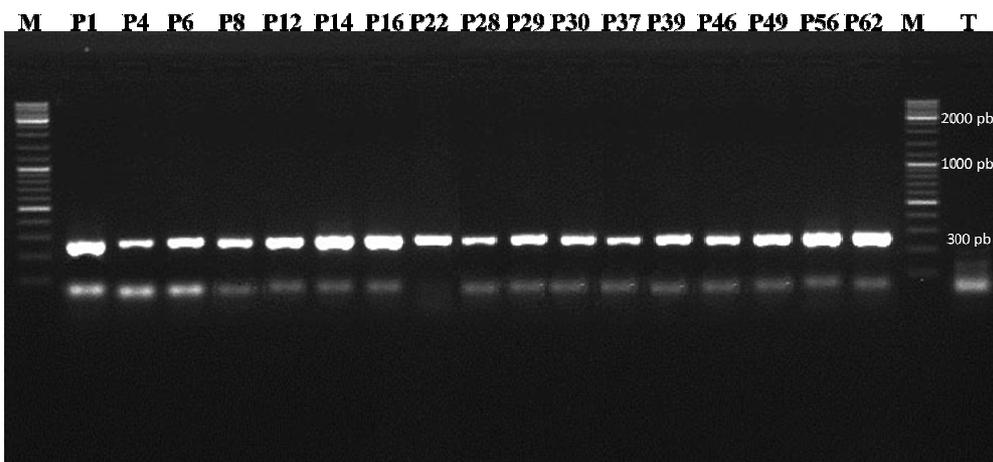
L'amplification du gène de la β -tubuline par les amorces T1 et Bt2b a généré un fragment unique pour les 17 isolats d'une taille d'environ 600 pb, comme le montre la figure 32.



*Fig. 32 : Produits d'amplification du gène des β -tubulines des 17 isolats *Phaeoacremonium* spp. par les amorces T1 et Bt2b ; M : marqueur de poids moléculaire (1kb) ; T : témoin sans ADN*

3.1.2.2. Amplification du gène de l'actine

La figure 33 montre l'amplification du gène de l'actine des 17 isolats à l'aide des deux amorces ACT 512F et ACT 783R générant un fragment d'environ 300 pb.



*Fig. 33: Produits d'amplification du gène d'actine des 17 isolats *Phaeoacremonium* spp. par les amorces ACT 512F et ACT 783R ; M : marqueur de poids moléculaire (1kb) ; T : témoin sans ADN*

3.1.2.3. Analyse phylogénétique

Les séquences des gènes de la β -tubuline et de l'actine des 17 isolats étudiés (annexe 6) ont été combinées et alignées avec des séquences de 50 isolats de références récupérés de GenBank, représentant une sélection de toutes les espèces du genre *Phaeoacremonium* connues. L'alignement combiné des 69 isolats, en comptant les 2 isolats outgroups, se composait de 854 caractères (y compris les écarts de l'alignement). Parmi eux, 392 ont été constants, 74 ont été variables et peu informatifs pour la phylogénie et 388 ont été informatifs pour l'analyse de parcimonie. L'analyse phylogénétique combinée des deux gènes a produit 4 arbres de parcimonie maximum ayant une longueur de 1614 pas, un indice de cohérence (CI) de 0,511, un indice de rétention (RI) de 0,857 et un indice d'homoplasie (HI) de 0,489. La topologie des arbres résultant des analyses de maximum de parcimonie (MP) et Neighbour joining (NJ) était similaire. Un des quatre arbres issus de l'analyse par MP est présenté dans la figure 34. Les isolats *Phaeoacremonium* spp. obtenus dans cette étude ont été groupés en clades bien soutenus avec quatre espèces publiés antérieurement. 7 isolats parmi les 17 ont été regroupés avec l'espèce *Pm aleophilum* ; ils sont bien soutenus statistiquement avec 100% de similarité pour les deux analyses (MP et NJ). 4 isolats se sont retrouvés dans un même groupe avec *Pm venezuelense*, avec des valeurs bootstrap de 100% et 99% POUR MP et NJ, respectivement. 5 isolats se sont regroupés avec *Pm parasiticum*, avec des valeurs bootstrap des 100% pour les deux analyses. P30 s'est apparenté avec *Pm hispanicum*, avec 98% et 96% d'homologie pour NJ et MP.

3.1.2.4. Soumission des séquences à GenBank

Les séquences des gènes de la β -tubuline et de l'actine des 17 isolats correspondant aux quatre espèces du genre *Phaeoacremonium*, ont été intégrées dans la base de données GenBank en utilisant le logiciel Sequin, qui permet de soumettre les séquences. Les numéros d'accès attribués aux différents isolats sont représentés dans le tableau 34.

Fig. 3-4: Un des 4 arbres phylogénétiques obtenu par un maximum de parcimonie à partir des séquences ITS (TL=1518 pas, CI=0.511, RI=0.857, HI=0.489). Les nombres sur les lignes sont les valeurs bootstrap supérieures à 70% avec un rééchantillonnage de 1000 fois. Les espèces de la présente étude sont représentées en gras. *Pleurostomophora richardsiae* et *Wuestneia molokaiensis* ont été utilisées comme outgroup.

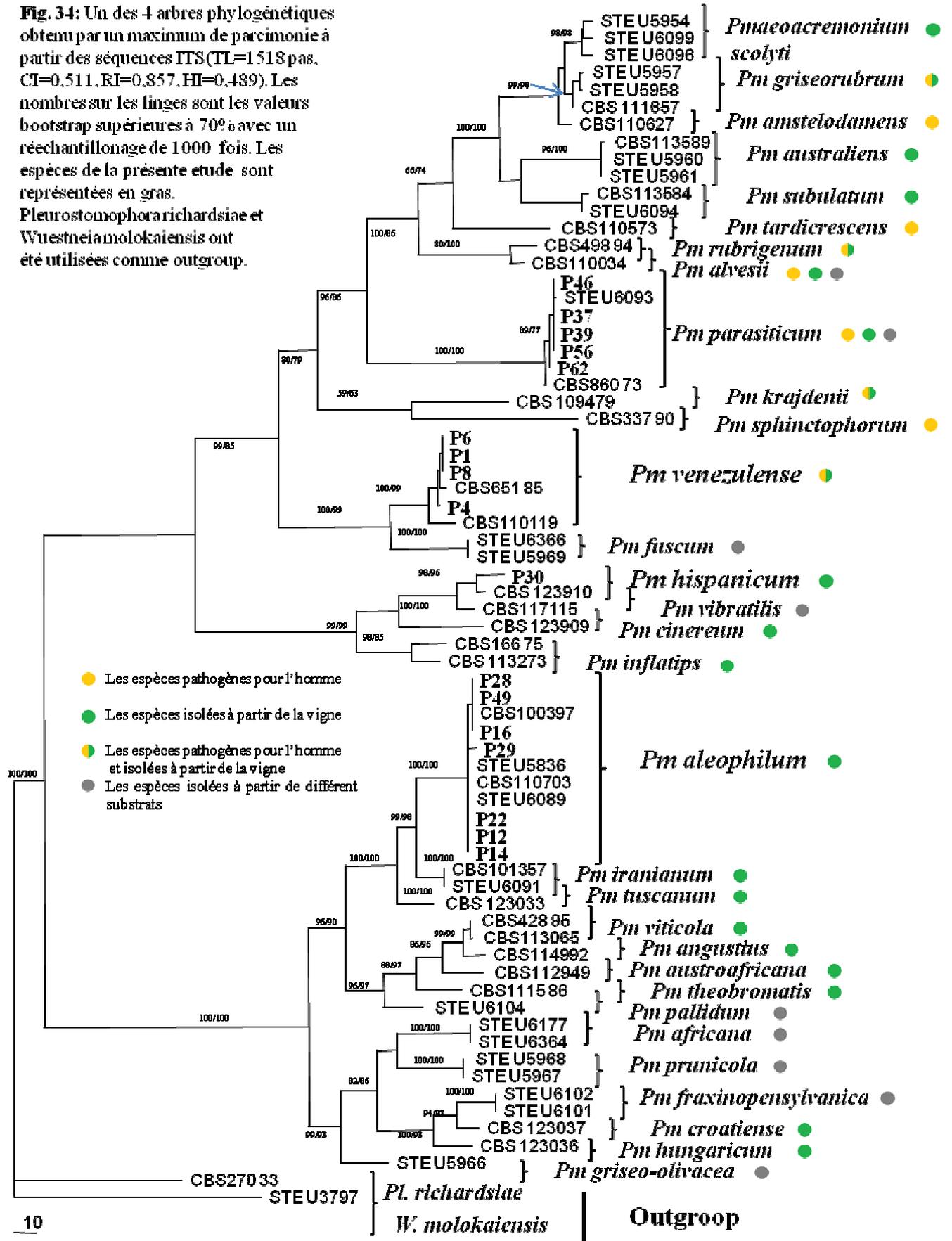


Tableau 34: Numéros d'accession à GenBank et données des espèces de *Phaeoacremonium* isolées dans cette étude

Espèces	Numéro d'isolat	Origine	Plante hôte	Collecteur	Numéro d'accession à GenBank	
					TUB	ACT
<i>Phaeoacremonium. aleophilum</i> (<i>Togninia minima</i>)	P12	Algeria. Tipaza	<i>V. vinifera</i>	A. Berraf-Tebbal	HQ605013	HQ605002
	P14	Algeria. Tipaza	<i>V. vinifera</i>	A. Berraf-Tebbal	HQ605014	HQ605003
	P16	Algeria. Tipaza	<i>V. vinifera</i>	A. Berraf-Tebbal	HQ605015	HQ605006
	P22	Algeria. Tipaza	<i>V. vinifera</i>	A. Berraf-Tebbal	HQ605016	HQ605007
	P28	Algeria. Tipaza	<i>V. vinifera</i>	A. Berraf-Tebbal	HQ605017	HQ605004
	P29	Algeria. Tipaza	<i>V. vinifera</i>	A. Berraf-Tebbal	HQ605018	HQ605008
	P49	Algeria. Tipaza	<i>V. vinifera</i>	A. Berraf-Tebbal	HQ605024	HQ605005
<i>Pm. parasiticum</i> (<i>T. parasitica</i>)	P37	Algeria. Tipaza	<i>V. vinifera</i>	A. Berraf-Tebbal	HQ605020	HQ604998
	P39	Algeria. Tipaza	<i>V. vinifera</i>	A. Berraf-Tebbal	HQ605021	HQ605000
	P46	Algeria. Tipaza	<i>V. vinifera</i>	A. Berraf-Tebbal	HQ605022	HQ605001
	P56	Algeria. Tipaza	<i>V. vinifera</i>	A. Berraf-Tebbal	HQ605010	HQ604999
	P62	Algeria. Tipaza	<i>V. vinifera</i>	A. Berraf-Tebbal	HQ605023	HQ604997
<i>Pm. venezuelense</i>	P1	Algeria. Tipaza	<i>V. vinifera</i>	A. Berraf-Tebbal	HQ605011	HQ604993
	P4	Algeria. Tipaza	<i>V. vinifera</i>	A. Berraf-Tebbal	HQ605012	HQ604995
	P6	Algeria. Tipaza	<i>V. vinifera</i>	A. Berraf-Tebbal	HQ605026	HQ605009
<i>Pm. hispanicum</i>	P8	Algeria. Tipaza	<i>V. vinifera</i>	A. Berraf-Tebbal	HQ605025	HQ604994
	P30	Algeria. Tipaza	<i>V. vinifera</i>	A. Berraf-Tebbal	HQ605019	HQ604996

3.2.Fréquences d'isolement des espèces *Phaeoacremonium* spp. et leur localisation au niveau des ceps

L'examen des tableaux 35 et 36, montre que les espèces *Phaeoacremonium* spp. ont été isolées à partir de 38 des 100 ceps de vigne qui présentaient des symptômes d'eutypiose et 23 des 100 ceps qui montraient les symptômes d'esca. Leur incidence est beaucoup plus importante au niveau des troncs que les bras. *Pm. aleophilum* est de loin l'espèce la plus fréquemment isolée (68,8%), suivie par *Pm. parasiticum* (16,4%) et *Pm. venezuelense* (13,12%). *Pm. hispanicum* a été isolée une seule fois à partir des 200 ceps analysés.

Parmi les quatre types d'altération du bois considérés (les nécroses A, B, CD et PN), les espèces *Phaeoacremonium* spp. ont été fréquemment isolées à partir de la nécrose brune et dure en position sectorielle (B), suivie par la nécrose claire et tendre en position sectorielle et centrale (CD) et seulement 9 isolats parmi les 61 ont été isolés à partir de la nécrose brune et dure en position centrale (A).

Tableau 35: Fréquences d'isolement des espèces *Phaeoacremonium* spp.

Agent fongique	Nombre d'isolats	Fréquence d'isolement %
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	42	68,8
<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>	10	16,4
<i>Phaeoacremonium venezuelense</i>	8	13,1
<i>Phaeoacremonium hispanicum</i>	1	1,6

Tableau 36 : Les espèces *Phaeoacremonium* spp. isolées à partir des nécroses des troncs et des bras des ceps dépéris.

		Eutypiose				Esca				Total
		A	B	PN	CD	A	B	PN	CD	
Troncs	<i>Pm. aleophilum</i>	5	13	1	5	1	7	4	4	40
	<i>Pm. parasiticum</i>	1	2	0	1	0	2	2	1	9
	<i>Pm. venezuelense</i>	2	2	0	2	0	2	0	0	8
	<i>Pm. hispanicum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bras	<i>Pm. aleophilum</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	2
	<i>Pm. parasiticum</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1
	<i>Pm. venezuelense</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Pm. hispanicum</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Total		8	20	1	9	1	11	6	5	61

A : Nécrose brune et dure en position centrale ; B : Nécrose brune et dure en position sectorielle ; CD : Nécrose claire et tendre (en position sectorielle et centrale) ; PN : Ponctuations noires.

3.3. Caractérisation morphologique des *Phaeoacremonium* spp.

La caractérisation morphologique a concerné les 17 isolats identifiés par l'analyse phylogénétique. Les mensurations des conidies ainsi que la croissance radiale des cultures à différentes températures, ont été réalisées sur 7 isolats appartenant à l'espèce *Pm aleophilum*, 5 isolats de *Pm parasiticum*, 4 isolats de *Pm venezulense* et sur l'unique isolat de *Pm hispanicum*.

3.3.1. *Phaeoacremonium aleophilum*

Les colonies des isolats de cette espèce diffèrent selon le milieu de culture. Sur le milieu MEA (Fig. 35a), elles sont rases avec une marge régulière. Selon les codes des couleurs de Rayner (1970), les cultures sont de couleur Isabelline (17''i). Sur milieu PDA (Fig. 35b), les colonies sont légèrement cotonneuses avec un contour irrégulier, leurs couleurs varient du Smoke Grey (21''f) à Greyish Sepia (15''i), selon les isolats. Elles diffusent un pigment jaunâtre sur ce milieu. Sur milieu OA (Fig. 35c), les colonies sont rases à légèrement cotonneuses, avec un contour régulier et une couleur Fuscous Black (7''k). La croissance mycélienne notée sur le milieu MEA à 25°C varie de 4 à 7 mm après huit jours d'incubation. Un optimum de croissance est obtenu à 30°C, un minimum à 10°C et un maximum à 37°C.

Le mycélium est ramifié, cloisonné, de couleur brun clair et se présente en bandelettes (Fig. 35d, e). Les conidiophores sont courts et souvent non ramifiés avec des phialides effilés et se terminent par une étroite collerette. Trois types de phialides sont distingués, selon la longueur : les phialides de type I (Fig. 35g), de type II (Fig. 35i, j) et de type III (Fig. 35k, l) avec une prédominance de ce dernier. Les conidies sont très abondantes, oblongues à allantoides (Fig. 35m, n) ; elles mesurent $(3,2-4) \times (0,9-1,5)$ à $(4,3-5,3) \times (1,5-2,3)$ μm ; la moyenne et l'écart-type de 50 conidies sont de $4,2 \pm 0,5$ par $1,6 \pm 0,25$.

3.3.2. *Phaeoacremonium parasiticum*

Les colonies de *Pm parasiticum* sur MEA (Fig. 36a) sont légèrement cotonneuses au centre ; elles présentent un contour régulier et une couleur Iron Grey (23''k). Sur milieu PDA, les colonies sont cotonneuses avec un contour irrégulier (Fig. 36b), leur couleur est Greyish Sepia (15''i). Sur milieu OA (Fig. 36c), les colonies sont poudreuses, avec un contour irrégulier et une couleur Grey olivaceous (21''). La croissance mycélienne enregistrée sur le milieu MEA à 25°C varie de 6 à 10 mm après huit jours d'incubation. Un optimum de croissance est obtenu à 30°C et un minimum à 15°C ; la température maximale limite de croissance est atteinte à 40°C.

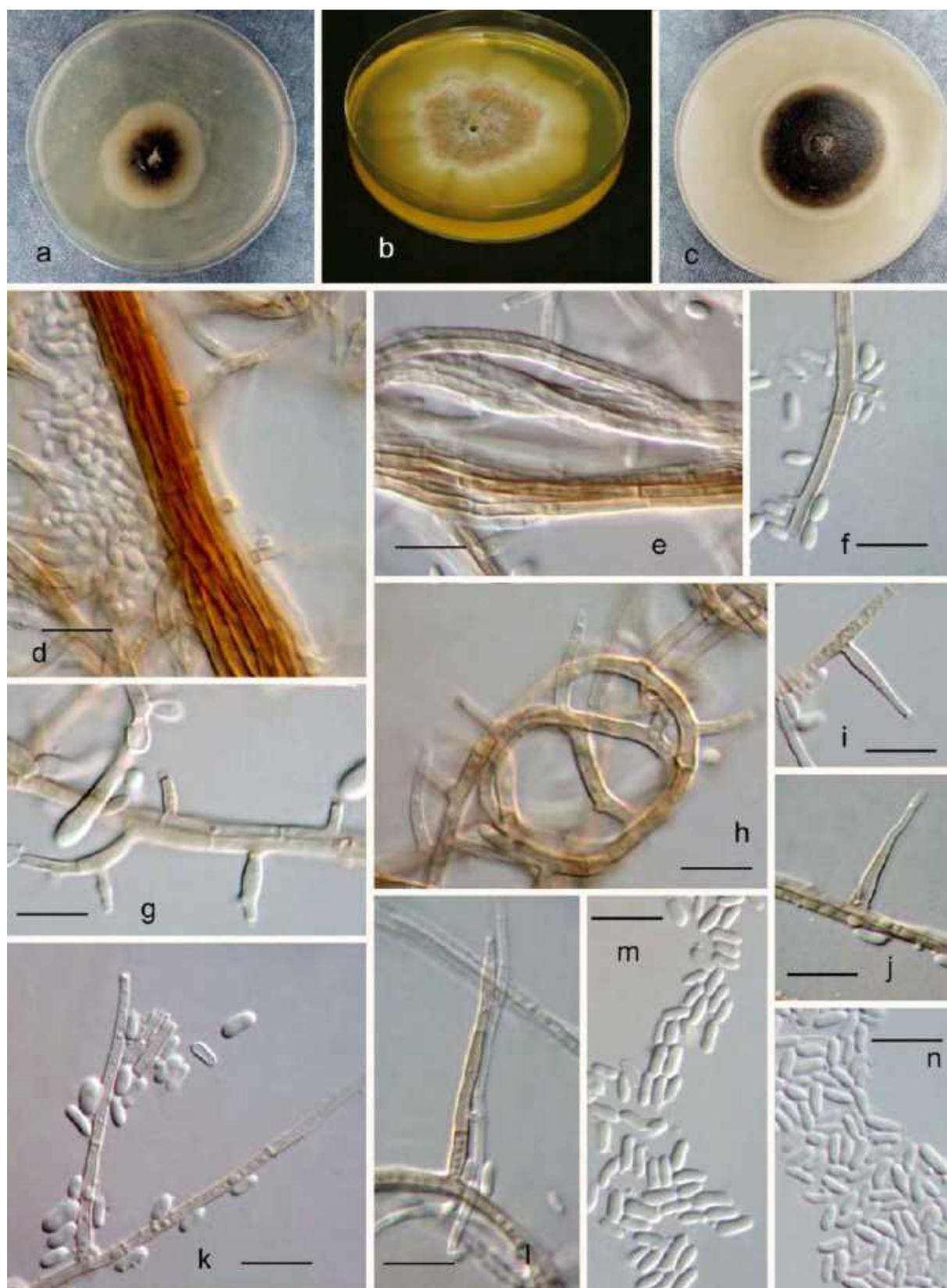


Fig. 35 : *Phaeoacremonium aleophilum*. a-c. Colonie âgée de seize jours sur MEA (a), PDA (b), OA (c). d, e. Filaments mycéliens agrégés. f, g, h. phialides de type I ; i, j. phialides de type II. k, l. phialides de type III. m, n. conidies. Barres d'échelle. 10μm.

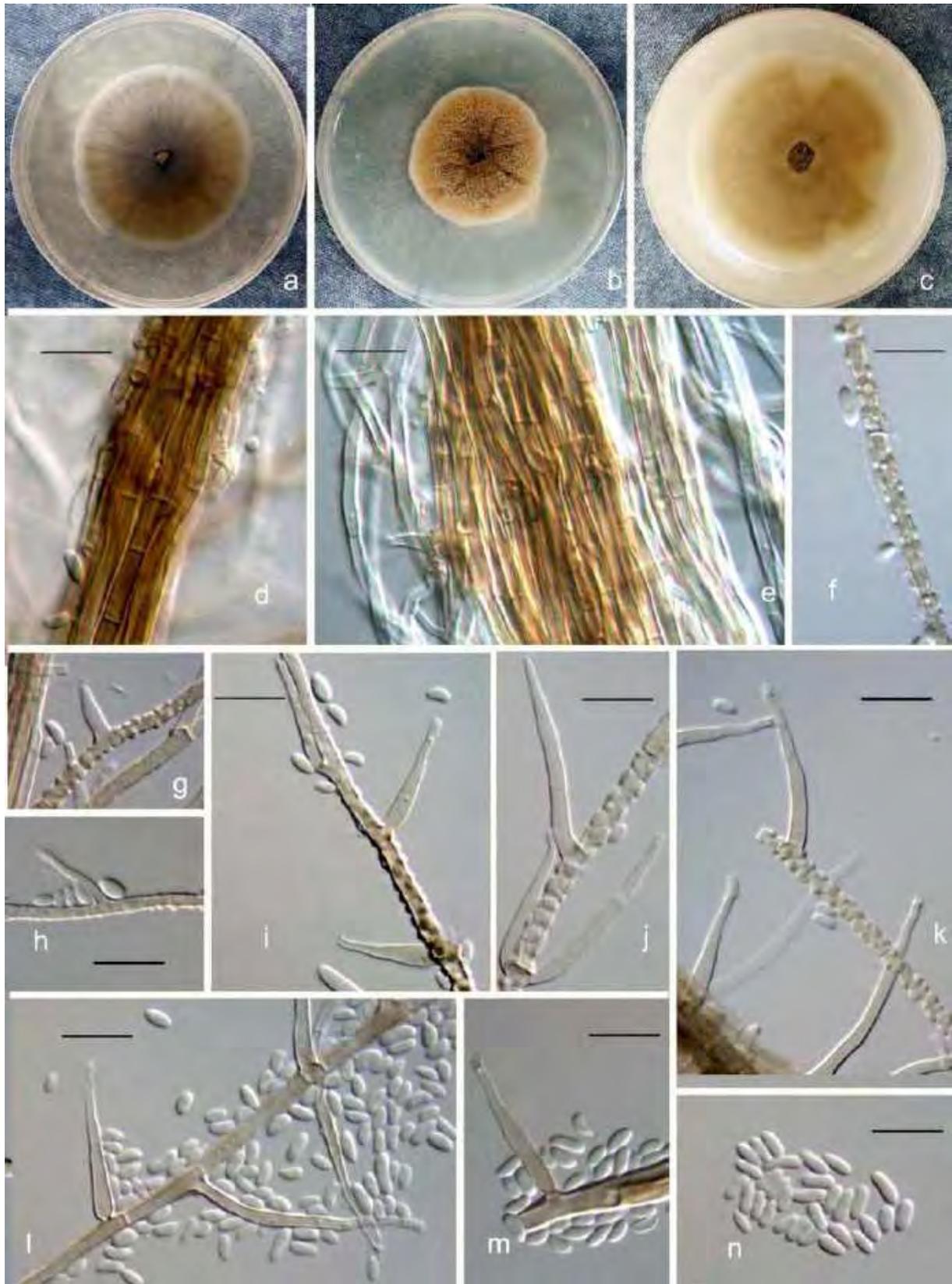


Fig. 36 : *Phaeoacremonium parasiticum*. a-c. Colonie âgée de seize jours sur MEA (a), PDA (b), OA (c). d, e. Filaments mycéliens agrégés. f. Mycélium présentant des gouttelettes d'exsudat caractéristique de l'espèce. , g, h. Phialides de type I ; h. Phialides de type II. i. Conidiophore ramifié ; j. Phialides de type III. k-m. Phialides de type III ; n. Conidies. Barres d'échelle. 10µm.

Le mycélium est ramifié, cloisonné et de couleur brun clair à brun foncé, organisé en bandelettes (Fig. 36d,e) avec de nombreuses gouttelettes d'exsudats, caractéristiques de l'espèce (Fig. 36f). Les conidiophores sont longs, ramifiés et légèrement bruns devenant pâles vers les extrémités. Les phialides sont effilés et se terminent par une étroite collerette, elles sont de trois types : type I (Fig. 36g), type II (Fig. 36h, i) et type III (Fig. 36 j,k,l,m) avec la prédominance du type III. Les conidies sont très abondantes, hyalines et oblongues (ellipsoïdales) à allantoïdes (Fig. 36n) ; mesurant (2,6-) 3,6 à 3,9 (-4,8) ×(1,3-) 1,6 à 1,8(-2,55) μm ; la moyenne et l'écart-type de 50 conidies sont de $3,8 \pm 0,5$ par $1,7 \pm 0,26$.

3.3.3. *Phaeoacremonium venezuelense*

Les colonies de *Pm venezuelense* sur MEA sont poudreuses au centre et rases vers les extrémités (Fig. 37a), leur contour est régulier et sont de couleur Greyish Sepia (15''''i). Sur milieu PDA (Fig. 37b), les colonies sont cotonneuses, particulièrement au centre avec un contour régulier, de couleur Sepia (13''''k). Sur milieu OA (Fig. 37c), les colonies sont poudreuses, avec un contour régulier et une couleur Olivaceous (21''''k). Elles atteignent un diamètre de 7 à 12 mm en huit jours à 25°C sur MEA.

Un optimum de croissance est atteint à 30°C, un minimum à 15°C et un maximum à 37°C. Le mycélium est ramifié, cloisonné, de couleur brun foncé et s'organise aussi en bandelettes (Fig. 37d,e). Les conidiophores sont courts, ramifiés et d'un brun foncé devenant pâles vers les extrémités. Les phialides sont effilés et se terminent par une étroite collerette. Les trois types de phialides sont observés ((Fig. 37j-r), avec toujours, la prédominance du type III. Les conidies sont très abondantes ; elles sont hyalines, oblongues (ellipsoïdales) ou fusiformes (Fig. 37u-w), elles mesurent (2,45-) 3,8 à 3,9 (-5,05) ×(0,9-) 1,3 à 1,5(-2,3) μm ; la moyenne et l'écart-type de 50 conidies sont de $3,8 \pm 0,5$ par $1,4 \pm 0,3$.

3.3.4. *Phaeoacremonium hispanicum*

La colonie de cette espèce est plate, rase avec un contour régulier et une couleur Vinaceous-Buff (15''''d) sur le milieu MEA (Fig. 38a). Sur le milieu PDA, la colonie est laineuse avec un contour légèrement irrégulier et de couleur Fawn (13''''') (Fig. 38b). La colonie sur OA est plate avec un contour régulier, ayant l'apparence d'une culture de levure (Fig. 38c). Sa couleur est Rosy-Buff (13''''d). La colonie se développe très lentement et atteint un diamètre de 3 mm après huit jours d'incubation à 25°C sur MEA. Un optimum de croissance est atteint à 25°C, un minimum à 10°C et un maximum à 37°C. Le mycélium est ramifié, cloisonné et de couleur brun clair à hyalin. Les conidiophores sont de longueur courte à moyenne, souvent

non ramifiés. Chaque conidiophore ramifié se termine par des phialides latéraux sub-hyalins à brun pâle ((Fig. 38d-j). Les phialides sont ampuliformes et étroits à la base et s'organisent de manière particulière, caractéristique de cette espèce (Fig. 38p-r). Les trois types de phialides sont présentes (Fig. 38h,j,k) avec une prédominance du type I (Fig. 38h,i). Les conidies sont hyalines, cylindriques ou allantoïdes (Fig. 38t-v) ; elles mesurent (5-)3-4(-6) x (1,5-) 2(-3) μm ; la moyenne et l'écart-type de 50 conidies sont de $3,4 \pm 0,36$ par $2,04 \pm 0,23$.

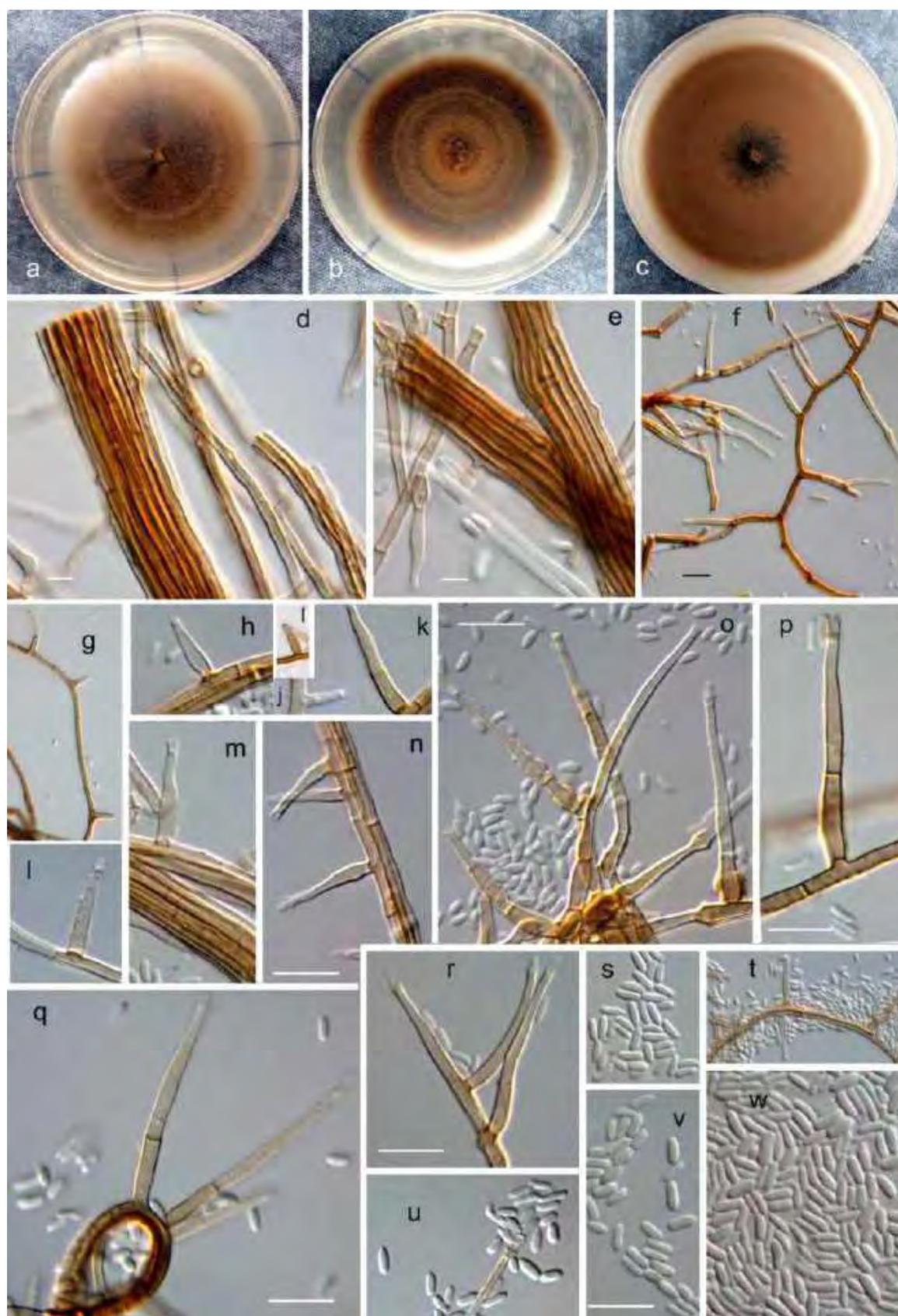


Fig. 37 *Phaeoacremonium venezuelense*. a-c. Colonie âgée de seize jours sur MEA (a), PDA (b), OA (c). d, e. Filaments mycéliens agrégés. f. Conidiophore ramifié. g-j. Phialides de type I; k-n. Phialides de type II. o-r. Phialides de type III. s- w. Conidies. Barres d'échelle. 10 μ m.



Fig. 38 :*Phaeoacremonium hispanicum*. a-c. colonie âgée de seize jours sur MEA (a), PDA (b), OA (c). d, conidiophore ramifié. e-i. phialides de type I ; j,k, m. phialides de type II. l-o. phialides de type III. p-r. rajeunissement des conidiophores, u, v. conidies. Barres d'échelle. 10μm.

4. Identification des espèces de la famille des *Botryosphaeriaceae*

4.1. Caractérisation moléculaire des *Botryosphaeriaceae*

L'étude a porté sur un total de 104 isolats appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae*, préalablement identifiés sur la base des caractères morphologiques (Tabl.29). La caractérisation moléculaire de l'ensemble de la collection s'est basée sur le génotypage par MSP-PCR complété par une analyse phylogénétique des isolats représentatifs de chaque groupe.

4.1.1. Génotypage des régions microsatellites par MSP-PCR

Deux amorces ont été testées séparément pour cet effet, le microsatellite (GTG)₅ et le minisatellite M13. Ces derniers ont généré diverses et complexes empreintes génomiques, qui varient selon les isolats et aussi avec l'amorce utilisée. Deux dendrogrammes ont été produits pour les deux amorces utilisées, basés sur la relation entre les différentes empreintes génomiques, à l'aide du logiciel Gel Compar.

Un meilleur génotypage de l'ensemble des isolats a été obtenue avec l'amorce (GTG)₅ (Fig. 40) dont les clusters ont été établis en combinant l'analyse numérique avec une comparaison visuelle des différentes bandes. En revanche, le dendrogramme obtenu avec l'amorce M13 n'a pas permis une bonne résolution des profiles, d'où son exclusion de l'étude.

En se basant arbitrairement sur un niveau de similarité de 58%, nous distinguons 6 clusters et 5 singletons (Fig. 40), dont les plus importants réunissent 57 et 39 isolats chacun. Ainsi, les 5 isolats formants les singletons, auxquels s'ajoutent 19 isolats, représentatifs de chaque cluster (et lorsque c'était possible, les isolats provenant des symptômes d'eutypiose et d'esca) ont été sélectionnés pour les analyses phylogénétiques et morphologiques.

4.1.2. Séquençage et phylogénie

4.1.2.1. Amplification des ITS

L'amplification de la région ITS comprenant l'espaceur ITS1, le gène 5.8S et l'espaceur ITS2 à l'aide des amorces universelles ITS1 et ITS4 (White et al., 1990) a généré un fragment unique d'environ 600 pb chez les 24 isolats (Fig. 41).

4.1.2.2. Amplification du gène du facteur d'élongation

L'amplification du gène EF-1 α par les amorces EF1-728F et EF1-986R des 24 isolats, a permis l'obtention d'un seul fragment d'environ 300 pb pour tous les isolats (Fig. 42).

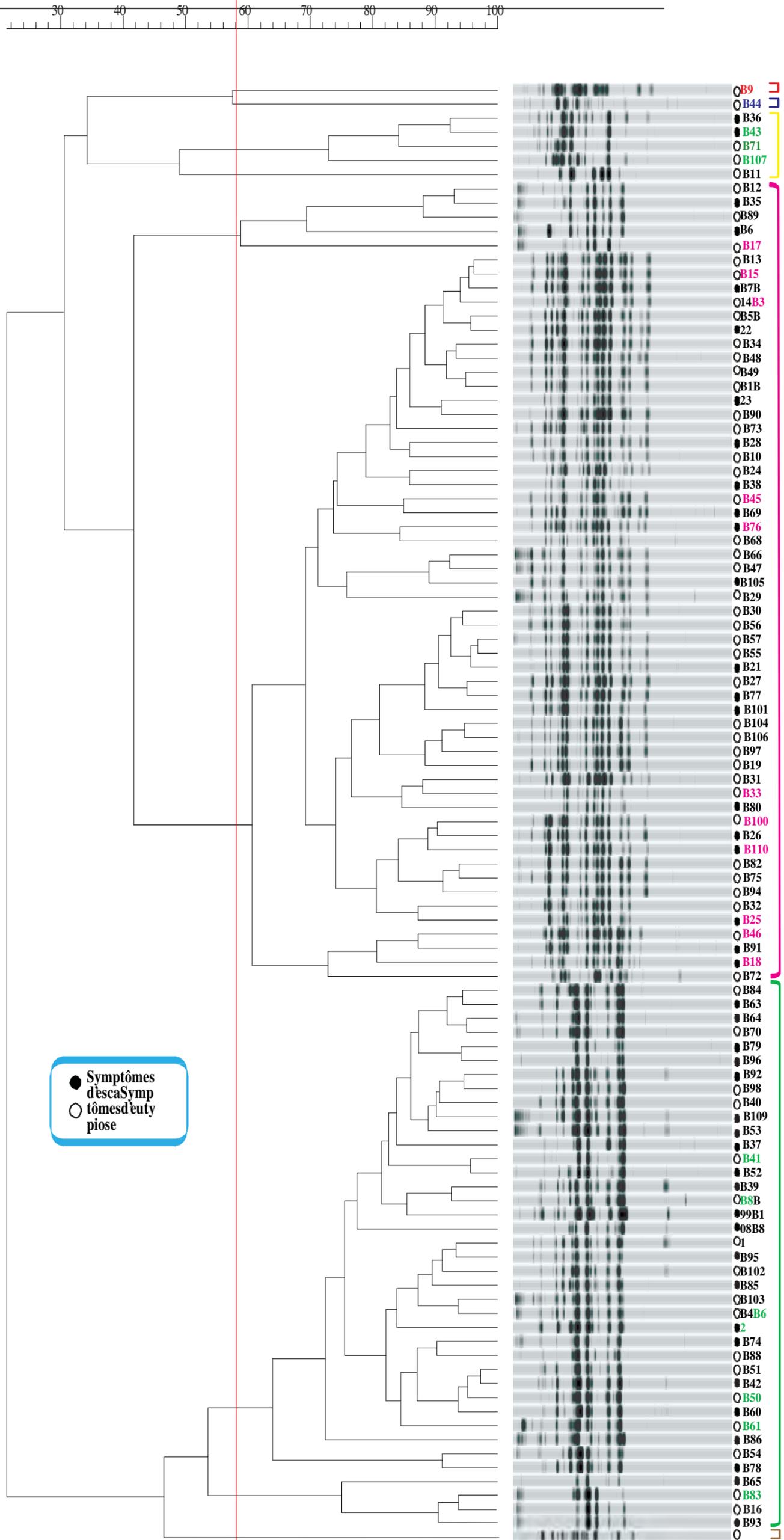


FIG.40: Dendrogramme des profils MSP-PCR obtenus avec l'amorce (GTG)₅. La ligne verticale correspond à un niveau de reproductibilité (58%) à partir duquel neuf groupes d'isolats sont déduits. Dans chaque groupe, les isolats mis en évidence en couleur ont été sélectionnés pour l'analyse phylogénétique. Toutes les empreintes génétiques ont été regroupées par similarité en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson et UPGMA. Les isolats obtenus dans cette étude à partir de vignes avec les symptômes d'eutypiose ou d'escas ont été indiqués par des cercles blancs et noirs, respectivement.

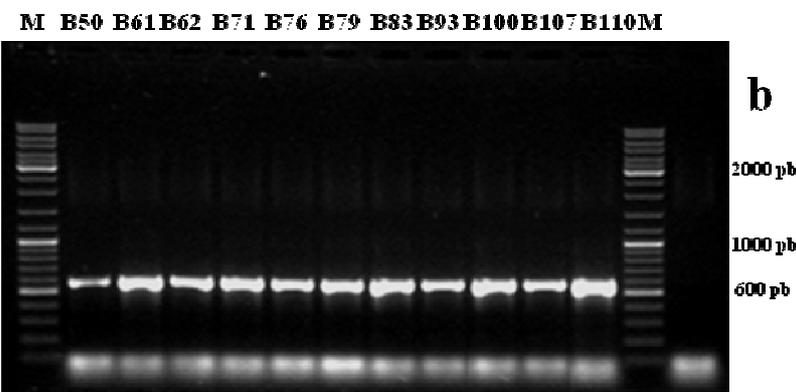
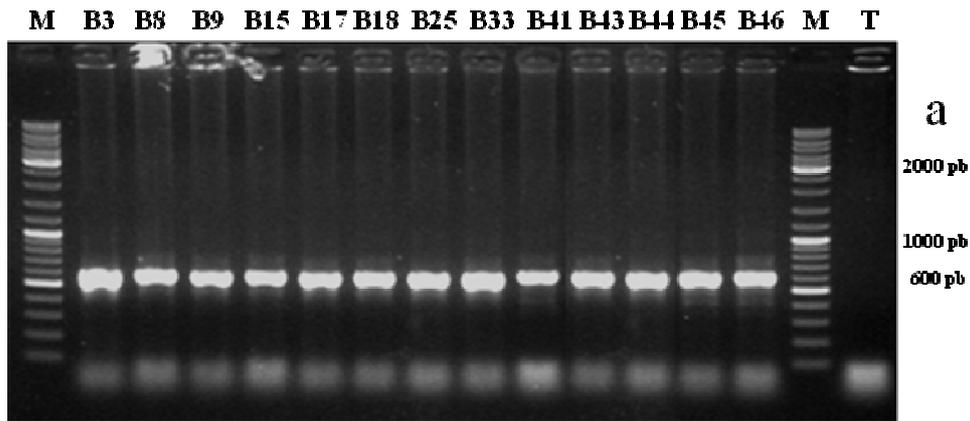


Fig 41a b: Produits d'amplification de la région ITS des 24 isolats des *Botryosphaeriaceae* par les amorces ITS1 et ITS4; M: marqueur de poids moléculaire (1kb).

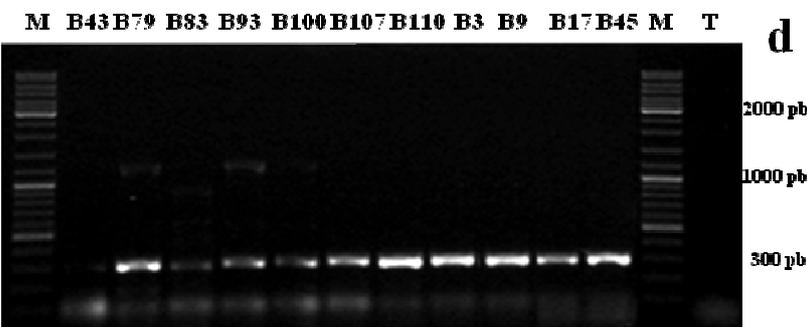
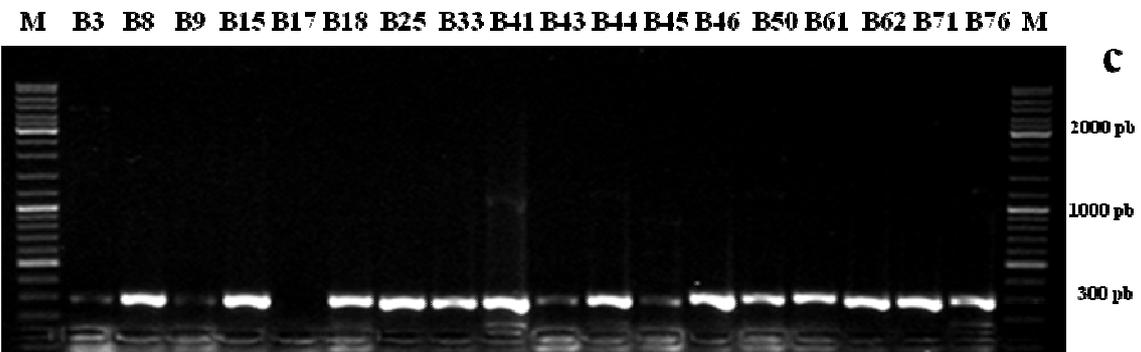


Fig 42 c d: Produits d'amplification du gène *EF-1α* des 24 isolats des *Botryosphaeriaceae* par les amorces EF1-728F et EF1-986R; M: marqueur de poids moléculaire (1kb).

4.1.2.3. Analyses phylogénétiques

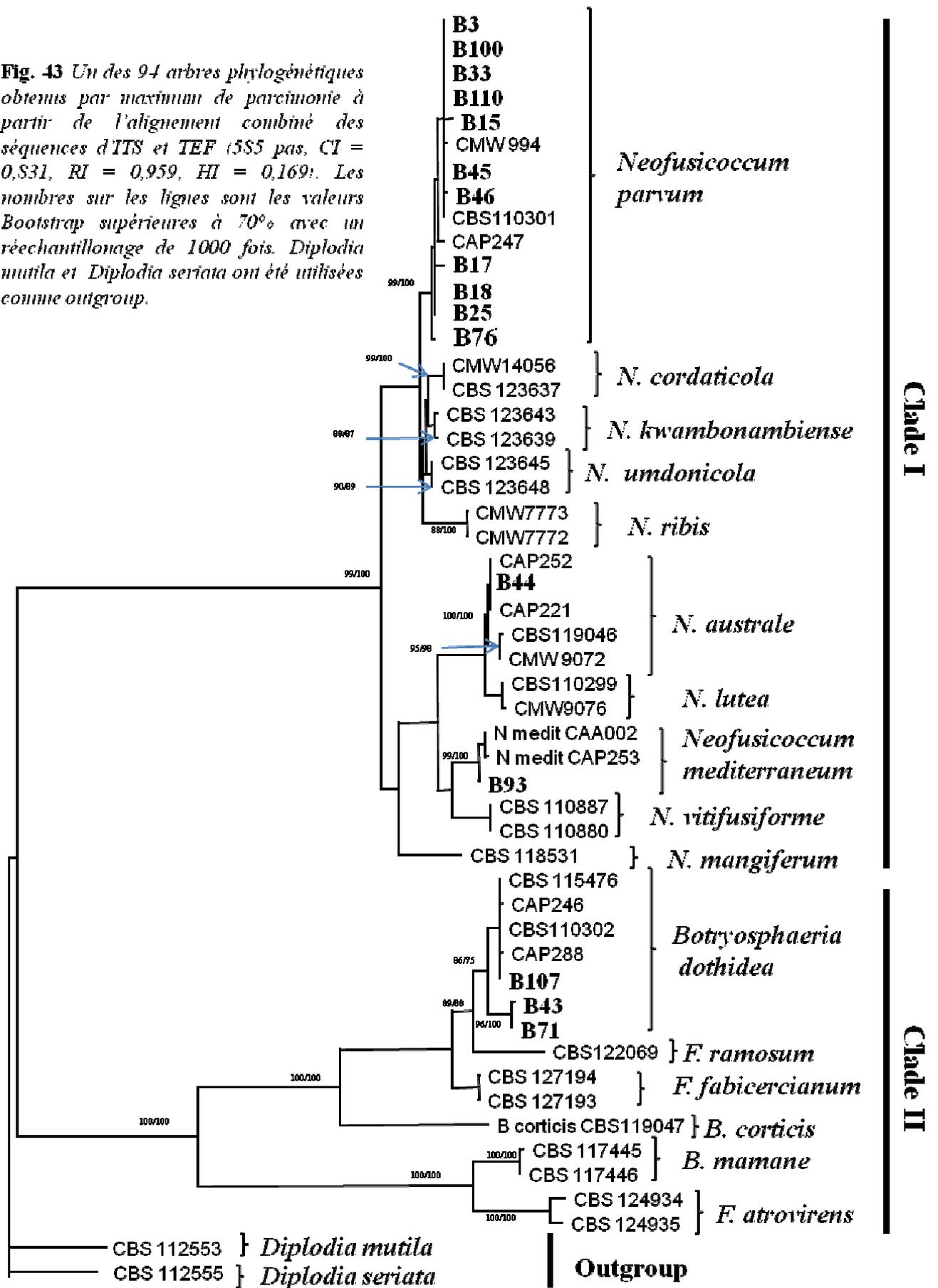
Afin de mieux positionner les isolats de cette étude parmi les différents genres appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae* et faciliter l'analyse phylogénétique, nous avons jugé utile de séparer les isolats en deux groupes. Le groupe I qui comporte les isolats avec des conidies hyalines et comprennent 16 isolats parmi les 24 isolats choisis pour la phylogénie et le groupe II qui inclut les isolats avec des conidies pigmentées et qui comprennent les 8 isolats restants. Ainsi, deux analyses phylogénétiques ont été réalisées séparément.

➤ Analyse phylogénétique du groupe I

Les séquences des gènes des ITS et celles de l'élongation facteur de 16 isolats (annexe 6) ont été combinées et alignées avec les séquences de 36 taxa récupérés de GenBank. L'alignement combiné des 52 taxa se composait de 848 caractères. Parmi eux, 490 ont été constants, 69 ont été variables et peu informatifs pour la phylogénie et 289 ont été informatifs pour l'analyse de parcimonie. L'analyse phylogénétique combinée des deux gènes a produit 94 arbres de parcimonie maximum ayant une longueur de 585 pas, un indice de cohérence (CI) de 0,831, un indice de rétention (RI) de 0,959 et un indice d'homoplasie (HI) de 0,169. La topologie des arbres résultant des analyses de maximum de parcimonie (MP) et Neighbour joining (NJ) était similaire. Un des 94 arbres issus de la méthode MP est présenté dans la figure 43. Deux clades se dessinent dans cet arbre ; le clade I comporte les espèces du genre *Neofusicoccum* et inclut 13 isolats de cette étude ; 11 taxa sont regroupés avec l'espèce *Neofusicoccum parvum* avec un support bootstrap de 99% (NJ)/ 100% (MP). L'isolat **B44** se regroupe avec l'espèce *Neofusicoccum australe* ; il est très bien supporté statistiquement avec 100% de similarité que ça soit pour l'analyse de MP ou NJ.

L'isolat **B93** appartient à l'espèce *Neofusicoccum mediterraneum* qui présentent 99% (NJ)/ 100% (MP) d'homologie. Le clade II inclut les espèces des genres *Fusicoccum* et *Botryosphaeria*. Trois taxa se regroupent avec l'espèce *Botryosphaeria dothidea* ; l'isolat **B107** forme avec les séquences de référence (CBS 115476, CBS110302, CAP246 et CAP288) un groupe homogène, robuste et distinct. Tandis que les isolats **B43** et **B71** se regroupent avec de faibles valeurs bootstrap de 86% (NJ)/ 75% (MP) (Fig. 43). Deux différences de paires de bases en ITS et deux autres en EF 1- α séparent ces isolats de l'espèce type *Botryosphaeria dothidea*.

Fig. 43 Un des 94 arbres phylogénétiques obtenus par maximum de parcimonie à partir de l'alignement combiné des séquences d'ITS et TEF (5S5 pas, CI = 0,831, RI = 0,959, HI = 0,169). Les nombres sur les lignes sont les valeurs Bootstrap supérieures à 70% avec un rééchantillonnage de 1000 fois. *Diplodia mutila* et *Diplodia seriata* ont été utilisées comme outgroup.

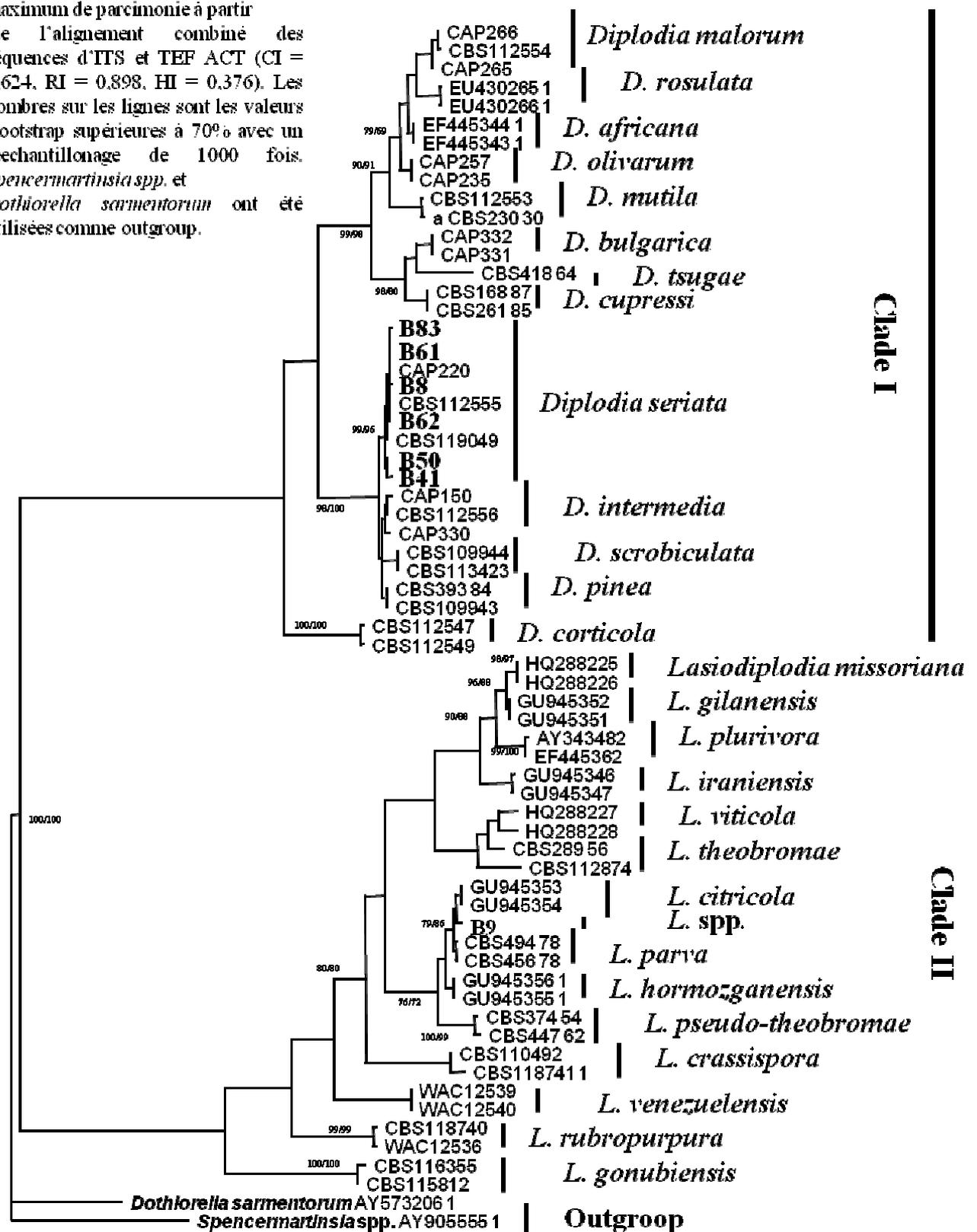


➤ Analyse phylogénétique du groupe II

L'alignement des séquences ITS combinées avec les séquences de l'élongation facteur contenait 66 taxa dont 8 appartiennent à cette étude (annexe 6) et 2 taxa outgroups. Les séquences comprises dans cet alignement incluaient 764 caractères dont 458 étaient constants, 53 étaient variables et 253 ont été informatifs pour la parcimonie. Deux arbres de topologie identique ont été obtenus des analyses de MP et NJ. Un arbre a été choisi parmi les 140 obtenus (Fig.44) et tous les arbres présentaient une topologie similaire. Ils possédaient un indice de cohérence (CI) de 0,624, un indice de rétention (RI) de 0,898 et un indice d'homoplasie (HI) de 0,376 ; faisant ressortir deux clades majeurs. Le clade I correspondait aux espèces appartenant au genre *Diplodia* alors que le clade II comprenait les espèces du genre *Lasiodiplodia*. 7 isolats se sont regroupés dans le clade I avec l'espèce *Diplodia seriata* avec 99% d'homologie pour NJ et 96% pour MP.

Au sein du clade II, un isolat (**B9**) se regroupe dans un sous clade qui inclut deux espèces du genre *Lasiodiplodia* (*Lasiodiplodia parva* et *Lasiodiplodia citricola*) avec des valeurs bootstraps de 79% et 86% pour MP et NJ respectivement (Fig. 44). L'isolat B9 diffère de *Lasiodiplodia parva* de 2 paires de bases en ITS et 4 en EF 1- α . Tandis qu'il se sépare de 2 pb en EF 1- α de *Lasiodiplodia citricola*.

Fig. 44 Un des 140 arbres phylogénétiques obtenus par maximum de parcimonie à partir de l'alignement combiné des séquences d'ITS et TEF ACT (CI = 0.624, RI = 0.898, HI = 0.376). Les nombres sur les lignes sont les valeurs Bootstrap supérieures à 70% avec un rééchantillonnage de 1000 fois. *Spencermartinsia* spp. et *Dothiorella sarmentorum* ont été utilisées comme outgroup.



4.2. Fréquences d'isolement des *Botryosphaeriaceae* et leur localisation au niveau des ceps

L'examen des tableaux 37 et 38, montre que les espèces des *Botryosphaeriaceae* ont été isolées à partir de 61 ceps parmi les 100 ceps qui présentaient les symptômes d'eutypiose et 43 des 100 ceps qui montraient les symptômes de l'esca. L'analyse phylogénétique a révélé l'existence de six espèces appartenant à quatre genres différents. *N. parvum* et *D. seriata* sont de loin les espèces les plus fréquemment isolées avec respectivement 54,8 et 37,5%. *B.dothidea*, *N. mediterraneum*, *N. australe* et *Lasiodiplodia* spp. ont été très peu isolées. Les fréquences d'isolement varient de 1% à 4,8%. *N. parvum* a été isolée plus particulièrement de la nécrose brune et dure en position sectorielle avec 40 isolats parmi les 57 et aussi, à partir de la nécrose claire et tendre (CD). *Diplodia seriata* a été isolée plus fréquemment à partir de la nécrose claire et tendre en position centrale et sectorielle (25 isolats parmi les 39) et de la nécrose brune et dure en position sectorielle (B). *B. dothidea* a été isolée à partir de la nécrose brune et dure en position sectorielle (B).

Tableau 37 : Fréquences d'isolement des *Botryosphaeriaceae*

Agent fongique	Nombre d'isolats	Fréquence d'isolement %
<i>Neofusicocum parvum</i>	57	54,8
<i>Diplodia seriata</i>	39	37,5
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	5	4,8
<i>Neofusicocum mediterraneum</i>	1	1
<i>Neofusicocum australe</i>	1	1
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	1	1

Tableau 38: Les espèces des *Botryosphaeriaceae* isolés à partir des nécroses des troncs et des bras des ceps déperis.

		Eutypiose				Esca			
		A	B	PN	CD	A	B	PN	CD
Troncs	<i>N. parvum</i>	2	21	0	11	0	16	2	0
	<i>D. seriata</i>	1	6	0	6	1	0	2	19
	<i>B. dothidea</i>	1	2	0	0	0	2	0	0
	<i>N. mediterraneum</i>	0	0	0	1	0	0	0	0
	<i>N. australe</i>	0	1	0	0	0	0	0	0
	<i>L. sp.</i>	0	0	0	1	0	0	0	0
Bras	<i>N. parvum</i>	0	2	0	2	0	1	0	0
	<i>D. seriata</i>	0	3	1	0	0	0	0	0
	<i>B. dothidea</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>N. mediterraneum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>N. australe</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
Total		4	35	1	21	1	19	4	19

4.3. Caractérisation morphologiques des espèces des *Botryosphaeriaceae*

La plupart des isolats ont formé des stromas conidifères contenant des conidies matures au bout de 14 à 21 jours d'incubation sur les aiguilles de pin à 25°C. Les stromas diffèrent morphologiquement entre les espèces. Cette différence s'observe au niveau de la forme, la couleur et le degré d'agrégation.

4.3.1. *Diplodia seriata*

Sur les aiguilles de pin, les stromas conidifères apparaissent isolés, parfois agrégés. Ils sont immergés dans l'hôte et dépourvus de mycélium. Ils sont d'un brun foncé à noire, à paroi épaisse. Une fois mûres, elles prennent souvent une forme globuleuse percée à son sommet d'un ostiole. Les ostioles sont courts et s'ouvrent vers l'extérieur en libérant les conidies (Fig. 45a.b.c.d). Ces dernières sont hyalines, aseptées et de forme ovoïde. Leur couleur devient rapidement marron foncé et peuvent, dans certains cas, présenter une cloison (Fig. 45g-m). Elles mesurent (20,6-) 23,5 à 25,3(-31,2) x (8,1-) 9,3 à 9,8(-11,5) µm, la moyenne et l'écart-type de 50 conidies sont de $24,4 \pm 2,5$ par $9,6 \pm 0,8$. Les colonies poussent rapidement sur le milieu PDA. Le mycélium est cotonneux avec un pourtour régulier. Sa couleur est blanche au départ, qui devient Leaden Grey (45''''') puis Dark Mouse Grey (13''''k) après deux semaine d'incubation à 25°C. Les taux de croissance mycélienne enregistrés sur PDA à 25°C varient de 12 à 14 mm après 24 h d'incubation. Un optimum de croissance est atteint à 25°C, un minimum à 10°C et un maximum à 35°C.

4.3.2. *Lasiodiplodia* sp.

Les stromas formés sur les aiguilles de pin sont souvent solitaires et parfois regroupés. Ils sont globuleux, de couleur grise au départ et deviennent plus foncés à maturité (Fig. 46a.b). Les ostioles sont courts libérant les conidies à maturité après environ deux semaines d'incubation. Des paraphyses hyalines sont observé entre les cellules conidiogènes; ces dernières sont subcylindriques et hyalines (Fig. 46c.d.). Les conidies sont oblongues, hyalines et aseptées au départ (Fig. 46e-f), puis à maturité deviennent brun foncé et séptées avec apparition de stries longitudinales irrégulières (Fig. 46h.i) ; elles mesurent (19,8-) 23 à 25(-31) x (11,9-) 14,1 à 15(-17,4) µm, la moyenne et l'écart-type de 30 conidies sont de $16,7 \pm 1,5$ par $6,04 \pm 0,46$. Les colonies sur PDA présentent un mycélium dense, aérien de couleur blanche au départ. Il devient Dull Green (27''m) après une semaine d'incubation à 25°C. Les colonies se développent très rapidement. Elles atteignent un diamètre de 80 à 84 mm après 24h d'incubation à 25°C sur PDA. Un optimum de croissance est atteint à 25°C, un minimum de 10°C et un maximum de 35°C.

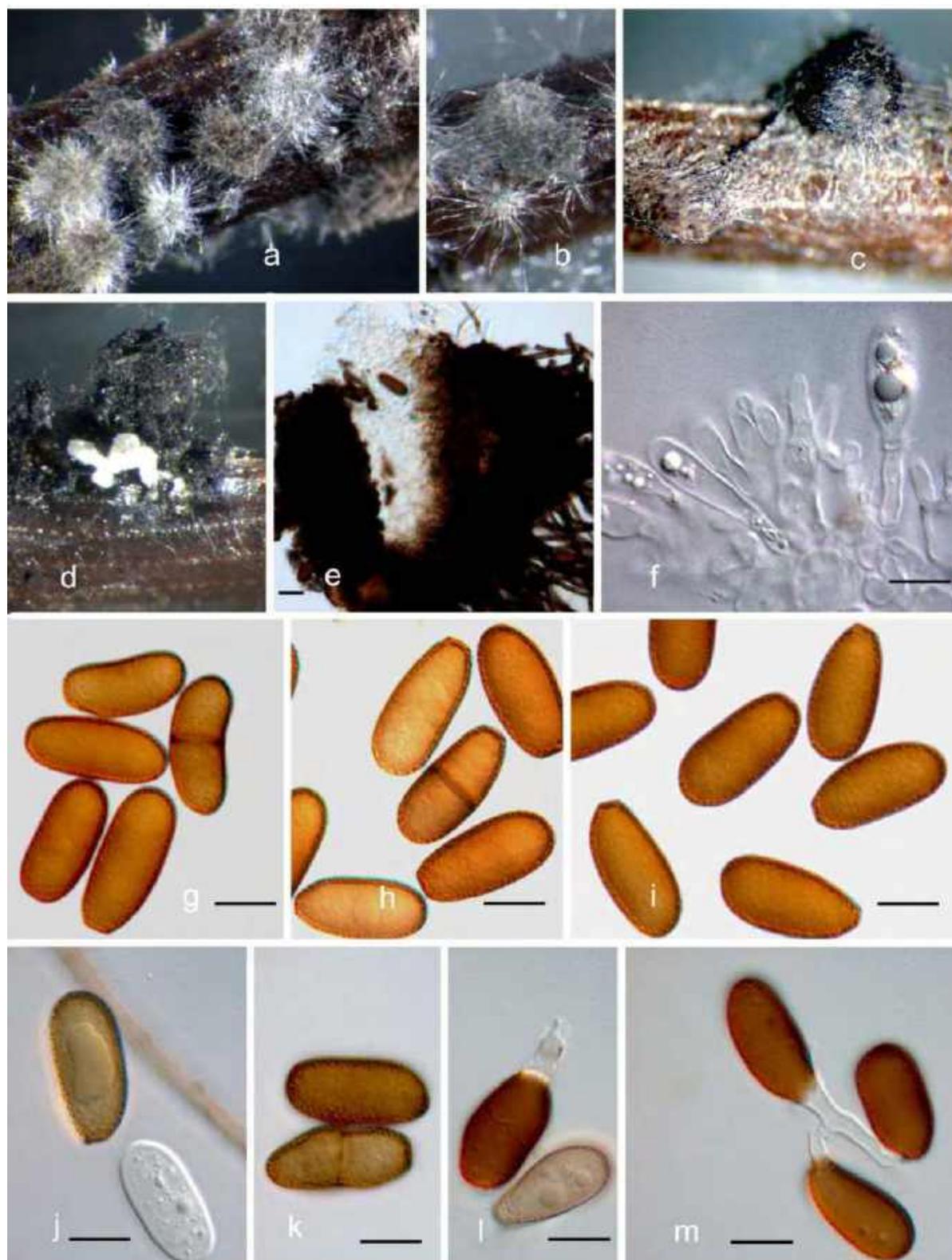


Fig. 45. *Diplodia seriata*. a-c. Stroma sur aiguilles de Pin. d. libération d'une masse de conidies à partir d'une pycnide. f. cellules conidiogènes libérant des conidies. g-k. conidies. l.m. germination des conidies. Barres d'échelle. a.b.c = 0,5 mm. f-m = 10 μ m.

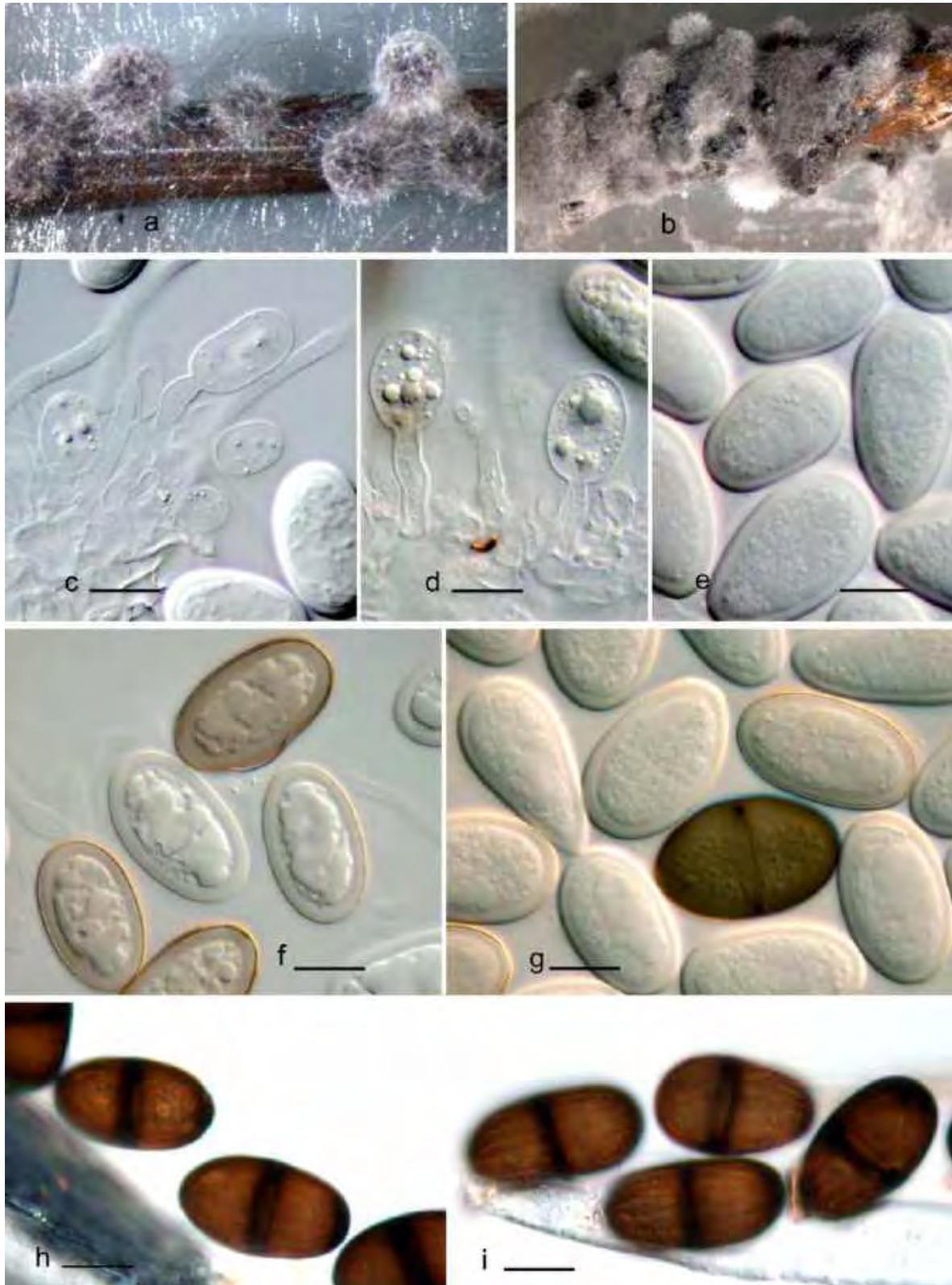


Fig 46. *Lasiodiplodia* spp. a.b stromas conidifères sur aiguilles de Pin. c. d. cellules conidiogènes. e-g. jeunes conidies. h.i. conidies âgées septées, présentant des stries longitudinales. Barres d'échelle. a. b. = 0,5 mm. c-i = 10 μ m.

4.3.3. *Neofusicocum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Neofusicocum australe* (Slippers, Crous & Wingf.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips, *Neofusicocum mediterraneum* Crous, M.J. Wingf. & A.J.L. Phillips

Ces espèces sont morphologiquement similaires dont les colonies sur PDA ne diffèrent guère les unes des autres et ne se distinguent que par la taille de leurs conidies. Sur les aiguilles de pin, les pycnides sont généralement solitaires, globuleuses, recouvertes d'un mycélium gris clair (Fig. 47, 48, 49). Elles se disposent superficiellement sur le tissu de l'hôte.

Les colonies des trois espèces sur PDA sont d'abord blanches avec un mycélium aérien abondant, qui devient Olivaceous Grey (8''''''i) et se développent rapidement atteignant un diamètre de 18 à 22 mm après 24h d'incubation à 25°C sur PDA. Un optimum de croissance est atteint à 25°C, un minimum à 10°C et un maximum à 35°C.

Les conidies de *N. parvum*, *N. australe* et *N. mediterraneum* produites sont hyalines à paroi mince, non cloisonnées, lisses, fusiformes à ellipsoïdale avec un apex obtus ou tronqué à base arrondie (Fig. 47j.k.l, 48f.h.j.k, 49c-f). Elles sont produites à partir de cellules conidigènes subcylindriques à fusiformes et hyalines (Fig. 47h.i, 49g). A maturité, les conidies deviennent souvent brun clair et développent 1 ou 2 cloisons (Fig. 48i,l). Notons la présence de paraphyses chez *N. mediterraneum* (Fig. 48d.e). Les conidies de *N. parvum* ont des dimensions de (13,9-) 16,2 à 17,2 (-19,7) × (5,1-) 5,9 à 6,2 (-6,9) µm, la moyenne et l'écart-type de 50 conidies est de 16,7 ± 1,5 par 6,04 ± 0,46. Les conidies du seul isolat de *N. australe* identifié dans la présente étude mesurent (17,12-) 19,4 à 21,8 (-25,3) × (4,17-) 5,3 à 6 (-7) µm ; la moyenne et l'écart-type de 20 conidies sont de 20,6 ± 2,7 par 5,6 ± 0,8.

Les conidies de l'unique isolat de *N. mediterraneum* mesurent (18,2-) 22,3 à 23,9 (-26,2) par (4,5-) 5,9 à 6,4 (-7,3) µm ; la moyenne et l'écart-type de 30 conidies sont de 23,1 ± 2,18 par 6,15 ± 0,63.

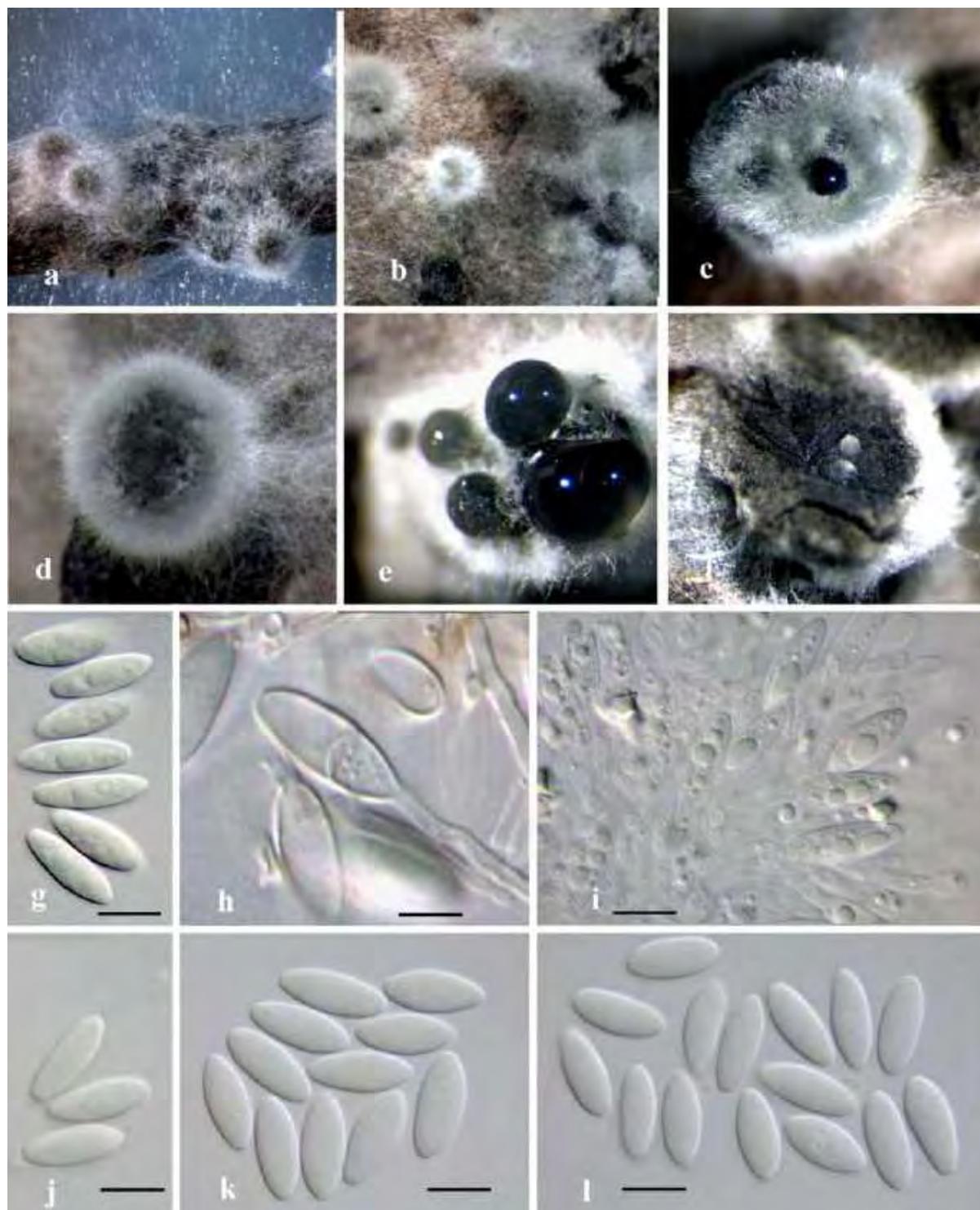


Fig 47. *Neofusicoccum parvum*. a-f Stromas sur aiguilles de Pin. i. cellules conidiogènes. g.j.k.l. conidies. Barres d'échelle. a.b = 0,5 mm. c-f=1mm g-l = 10μm.

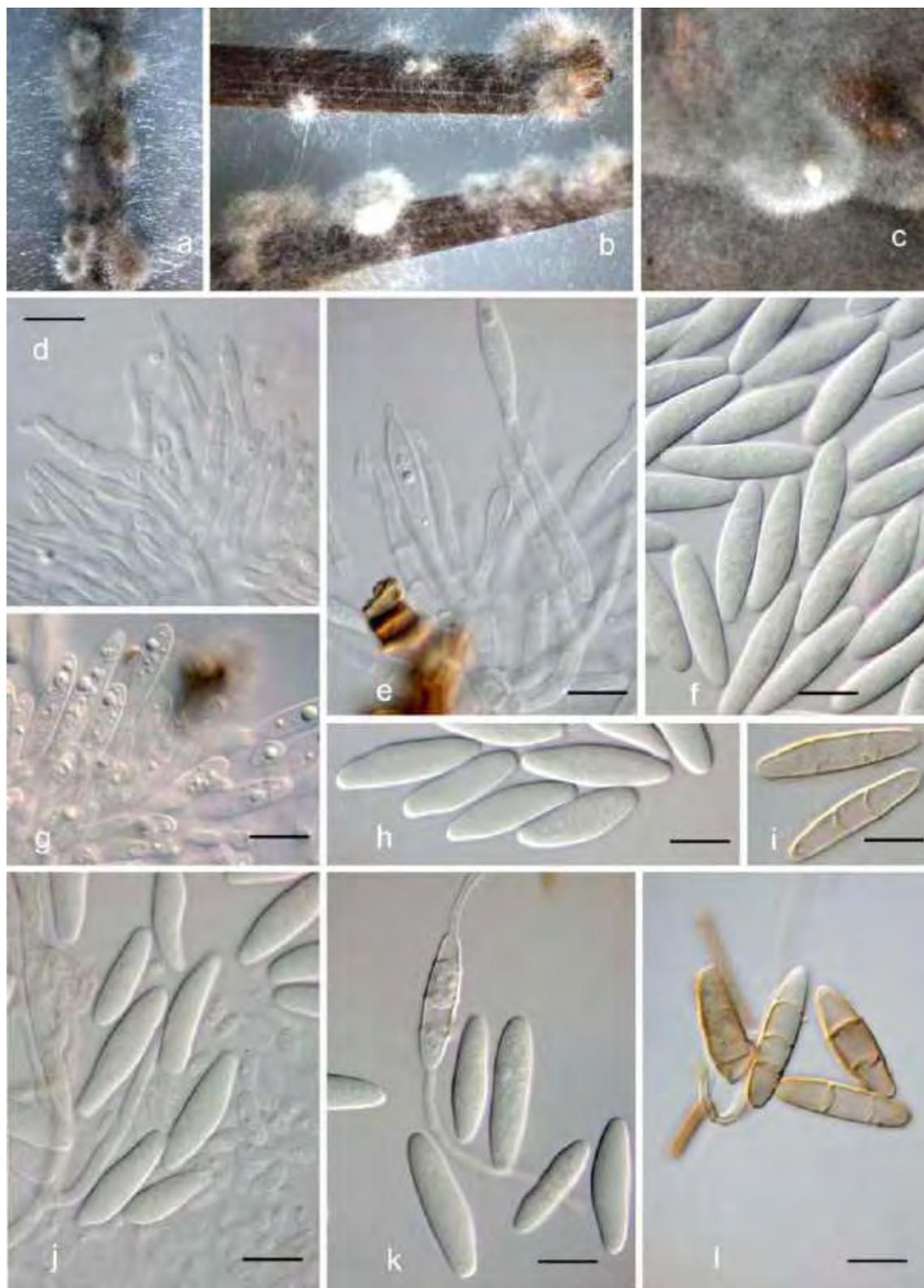


Fig 48. *Neofusicoccum mediterraneum*. a-c Stromas sur aiguilles de Pin. d.e. paraphyses. g. cellules conidiogènes. f.h.j.k.i. conidies. i.l. Conidies agées, septées. Barres d'échelle. a. b = 0,5 mm. c=1mm d-l = 10 μ m.



Fig 49. *Neofusicoccum australe*. a.b. Stromas sur aiguilles de Pin. c. conidies. Barres d'échelle. b.c = 0,5 mm. a.d=1mm e.f = 10 μ m.

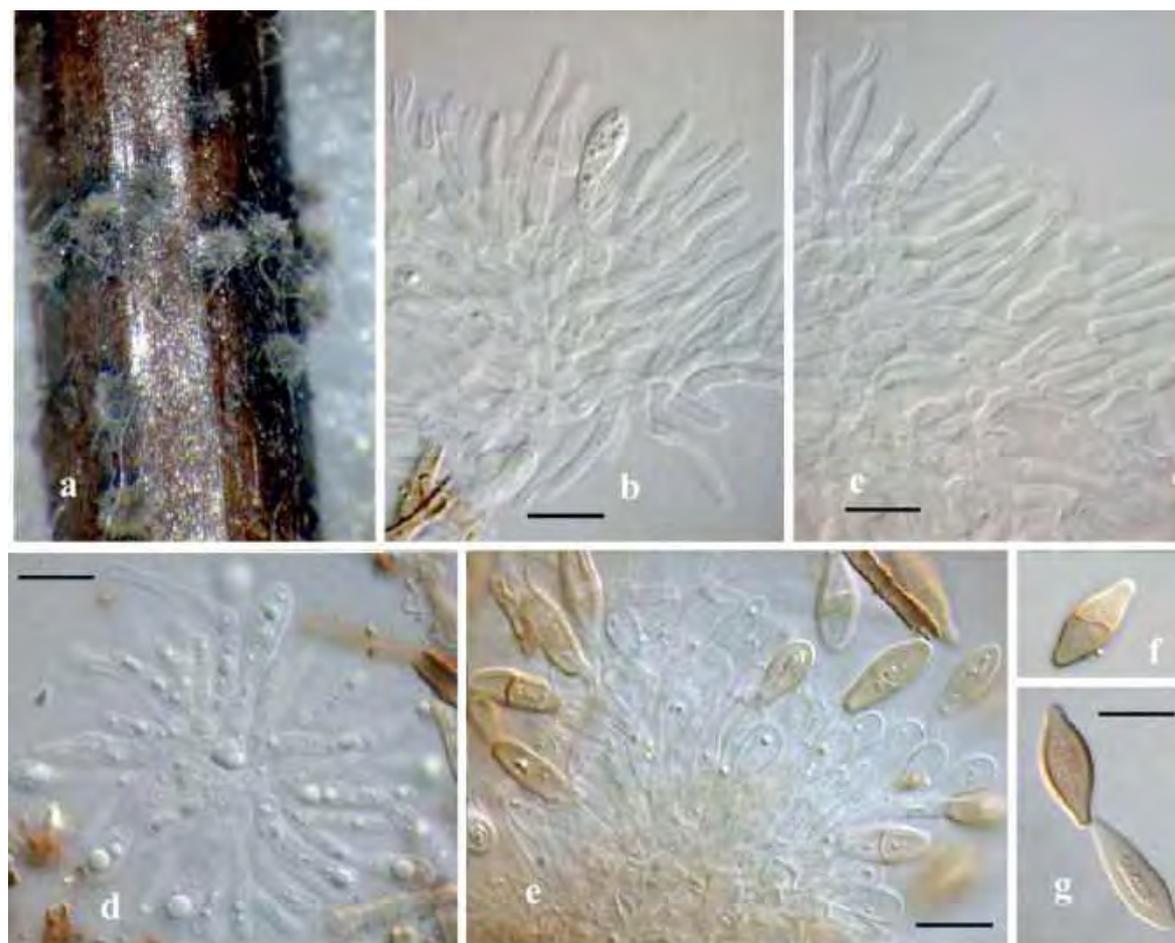


Fig 50. *Botryosphaeria dothidea* a. Stromas sur aiguille de Pin. b.c. paraphyses d. conidiophores. f.g. conidies. Barres d'échelle. a = 1mm. b-g = 10 μ m.

4.3.4. *Botryosphaeria dothidea* (Moug.:Fr.) Ces. & De Not.

Sur les aiguilles de pin, les pycnides sont généralement solitaires, globuleuses, recouvertes d'un mycélium gris foncé (Fig. 50). Elles se disposent superficiellement sur le tissu de l'hôte. Les colonies sur PDA sont d'abord blanches avec un mycélium aérien abondant, devenant progressivement Mouse Grey (13''''i) puis violet Slate (59''k). Cette coloration s'étend progressivement vers le bord et devient de plus en plus sombre jusqu'à devenir blood color (71'm). Les colonies se développent rapidement ; elles atteignent un diamètre de 17 à 20 mm après 24h d'incubation à 25°C sur PDA. Un optimum de croissance est atteint à 25°C, un minimum à 10°C et un maximum à 35°C.

Les conidies de *B. dothidea* sont fusiformes, à base légèrement tronquée à arrondie, hyalines et lisses, deviennent brun clair, avec l'âge et développent 1 ou 2 cloisons (Fig. 50f.g.). Elles sont produites à partir de cellules conidiogènes fusiformes (Fig. 50b-e) ; elles mesurent (12-) 15,6-17 (-19,9) par (4,1) 5,5 à 5,9(-7,1) µm; la moyenne et l'écart-type de 50 conidies sont de $23,1 \pm 2,18$ par $6,15 \pm 0,63$.

5. Identification des *Phaeomoniella* spp.

L'étude a porté sur un total de 120 isolats (Tabl. 30) préalablement identifiés sur la base de méthodes phénotypiques. Le génotypage de l'ensemble de la collection a été suivi des analyses phylogénétiques et morphologiques.

5.1. Caractérisation moléculaire des *Phaeomoniella* spp.

5.1.1. Génotypage des régions microsattellites par MSP-PCR

Des empreintes génétiques ont été obtenues pour 84 isolats parmi les 120, en utilisant l'amorce M13. L'analyse des différents profils génotypiques a permis la construction d'un dendrogramme qui illustre les relations génétiques existantes entre les isolats (Fig. 51). D'emblée, nous avons constaté qu'à 80% de similarité, nous distinguons 3 clusters et 5 singletons. Le premier cluster est composé de 13 isolats, le second comprend 2 isolats et le troisième, inclut un nombre important représenté par 64 isolats. Tandis que les 5 isolats restants, constituent chacun une seule ligne et montre une tendance à l'individualisation. Par conséquent, afin de confirmer l'identification, 16 isolats représentatifs de chaque groupe ont été sélectionnés pour le séquençage et les analyses phylogénétiques et morphologiques (Fig. 51).

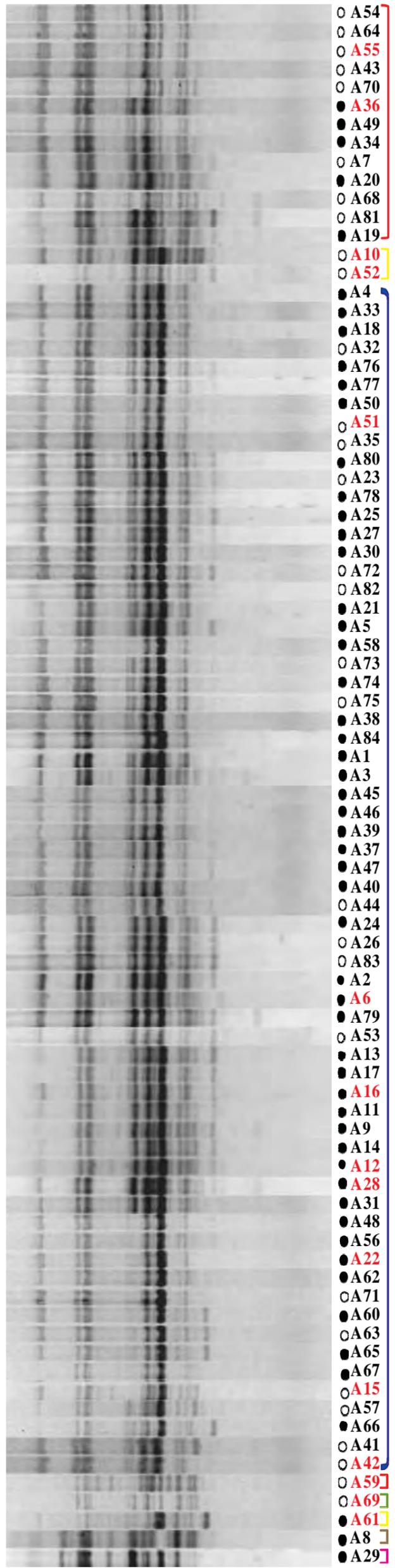
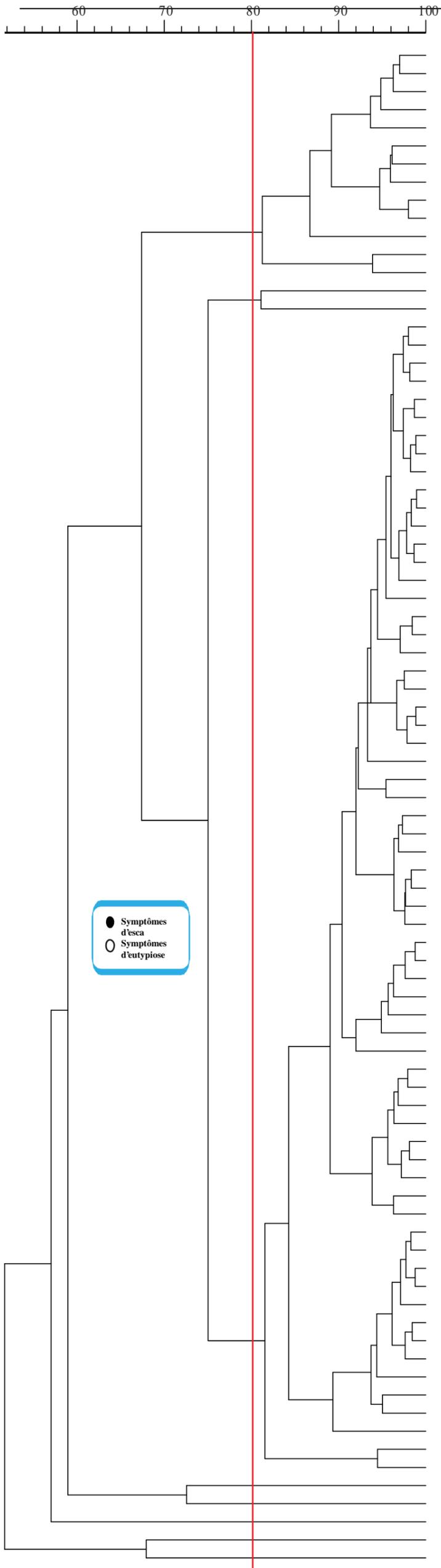


FIG.51:Dendrogrammesdesprofiles MSP-PCR obtenusavecl'amorceM13.Laligneverticale correspondauniveaudereproductibilité(80%)àpartirdelaquellehuit groupesd'isolatssontdéduits.Dans chaquegroupe,lesisolatsmisenévidenceencecouleurontétésélectionnéspourl'analyseph ylogénétique.Touteslesempreintesgénétiquesontétéregroupéesparsimilaritéenutilis antlecoefficientdecorrélationdePearsonetUPGMA.Lesisolatsobtenusdanscetteétud eàpartirdevignesaveclessymptômesd'eutyposoud'escasontindiquéspardescercles blancsetnoirs,respectivement.

5.1.2. Séquençage et phylogénie

5.1.2.1. Amplification des ITS

L'amplification de la région ITS à l'aide des amorces universelles ITS1 et ITS4 (White *et al.*, 1990) a généré un fragment unique d'environ 600 bp pour l'ensemble des isolats du genre *Phaeomoniella* (Fig. 52).

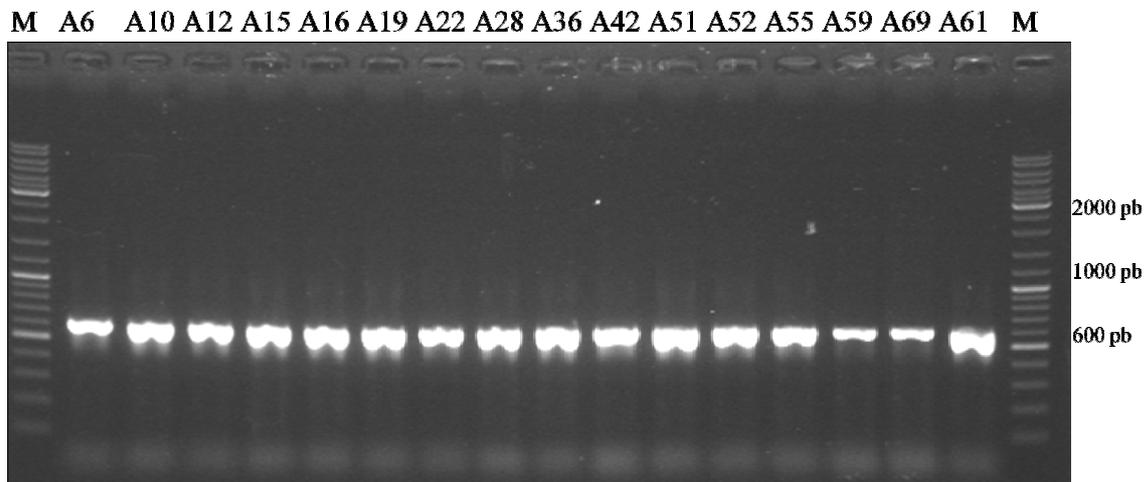


Fig 52 : Produits d'amplification de la région ITS des 16 isolats *Phaeomoniella* spp. Par les amorces ITS1 et ITS4 ; M : marqueur de poids moléculaire (1kb)

5.1.2.2. Analyse phylogénétique

L'alignement des séquences ITS (annexe 6) renferme 32 taxa, dont deux ougroupes appartenant au genre *Phaeoacremonium*. Dans cet alignement de séquences, sur les 577 caractères, 268 étaient constants, 30 étaient variables et peu informatifs et 279 ont été informatifs pour l'analyse de parcimonie. Un arbre a été choisi parmi les deux arbres obtenus (Fig. 53). Il possède un indice de cohérence (CI) de 0,756, un indice de rétention (RI) de 0,858 et un indice d'homoplasie (HI) de 0,244. Le genre *Phaeomoniella* inclut 8 espèces retirées de GenBank dont l'analyse phylogénétique fait ressortir deux clades majeurs. Le clade I correspond à une seule espèce « *Phaeomoniella chlamydospora* » à laquelle s'apparentent les 16 isolats de cette étude avec 100% d'homologie pour les deux analyses (NJ et MP). Le clade II regroupe les autres espèces du genre *Phaeomoniella*, très bien soutenues statistiquement avec des valeurs bootstraps de 100% pour les deux analyses.

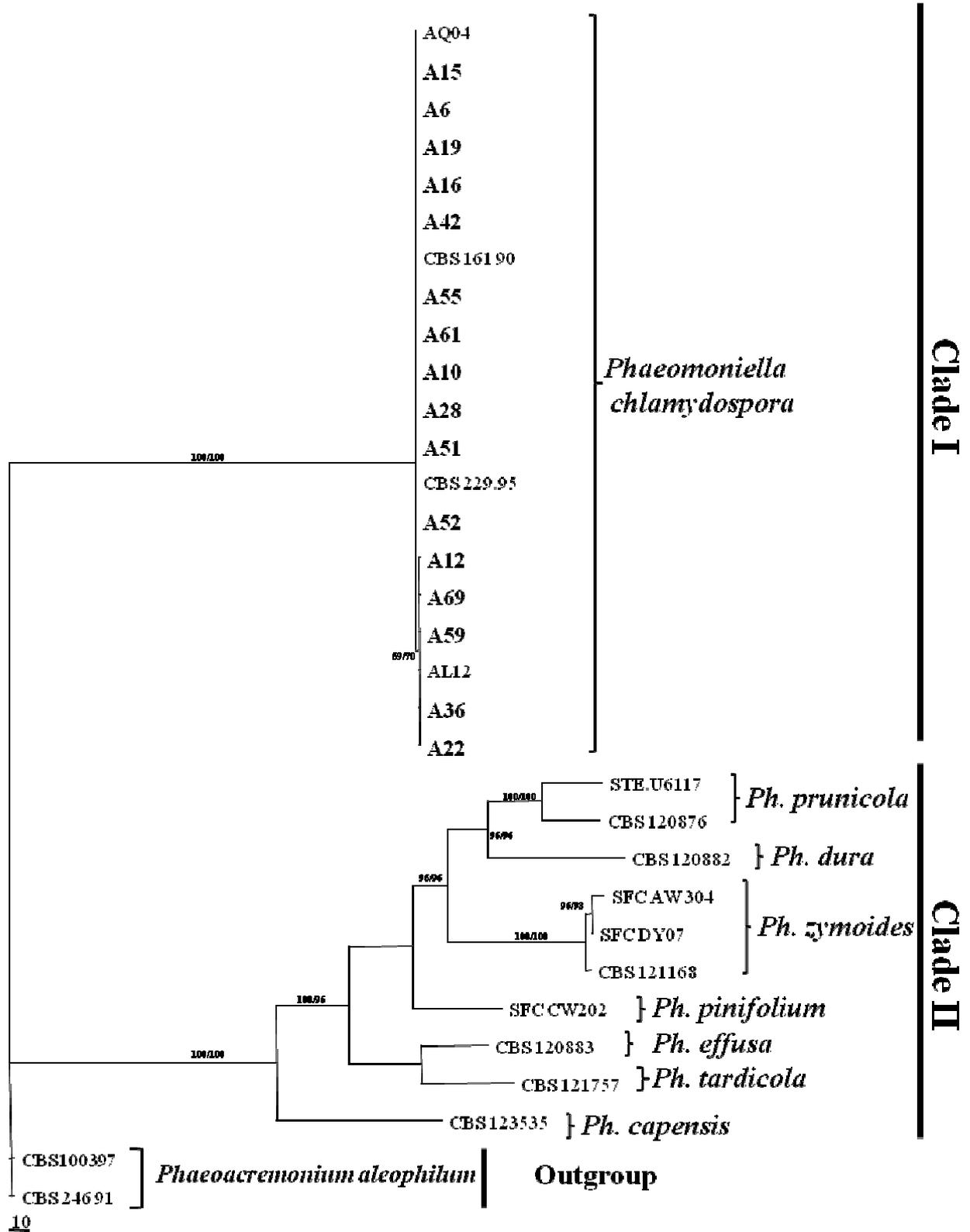


Fig. 53 Un des deux arbres phylogénétiques obtenus par maximum de parcimonie à partir des séquences ITS (TL = 1518 pas, CI = 0,756, RI = 0,858, HI = 0,244). Les nombres sur les lignes sont les valeurs bootstrap supérieures à 70% avec un rééchantillonnage de 1000 fois. Les espèces présentes en Algérie sont représentées en gras. *Phaeoacremonium aleophilum* a été utilisée comme outgroup.

5.2. Caractérisation morphologique de *Phaeoconiella chlamydospora*

Sur milieu PDA, les colonies sont tout d'abord Buff (19''f), puis Dark Green (33 m) pour devenir Leaden Black (47''''k). Elles sont circulaires à contour régulier et de texture lisse (Fig. 54a). Le mycélium est ramifié, cloisonné et de couleur brun verdâtre (Fig. 54b.c) montrant des conidiophores simples, courts, épais et de couleur foncée. Les phialides sont plus claires et se terminent par des collerettes tubulaires (Fig. 54f-l). Les conidies produites sont hyalines, oblongues à ellipsoïdales, regroupées à l'apex du phialide (Fig. 54k.m.n). et mesurant (2,23-3,06 à 3,33 (-4,45) par (1,05) 1,41 à 1,53(-2,25) μm ; la moyenne et l'écart-type de 50 conidies sont de $1,47 \pm 0,29$ par $2,21 \pm 0,41$.

Des chlamydospores apparaissent sur des cultures âgées de plus d'un mois; elles sont abondantes, globuleuses à sub-globuleuses, la plupart du temps elles sont solitaires (Fig. 54c.f.). mais nous les retrouvons aussi, en chaînettes (Fig. 54d). Elles se caractérisent par leur paroi épaisse, de couleur verte olivâtre.

La colonie se développe très lentement. Elle atteint un diamètre de 2,5 mm après huit jours d'incubation à 25°C sur PDA. Un optimum de croissance est atteint à 25°C, un minimum à 15°C et un maximum à 35°C.

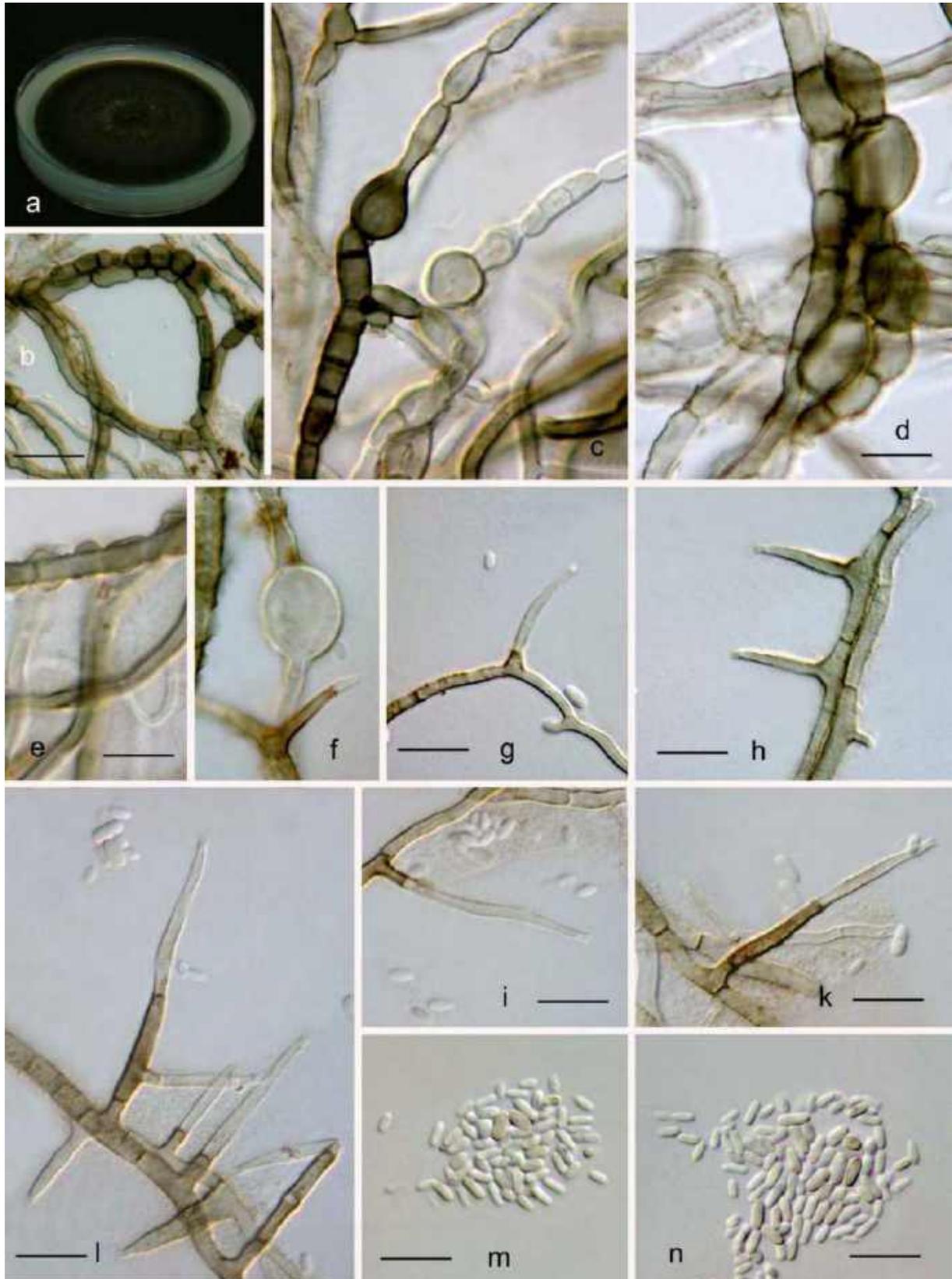


Fig. 54 : *Phaeoconiella chlamydospora* a. colonie âgée d'un mois sur PDA. b-d. mycélium présentant des chlamydospores. e. mycélium présentant des gouttelettes d'exsudat. , f. g.i.k. phialides. h. i. conidiophores branchés ; m.n. conidies. Barres d'échelle. 10μm.

6. Identification d' *Eutypa* spp.

La collection d' *Eutypa* spp. est composée de 60 isolats, caractérisés par le biais de méthodes phénotypiques (Tabl. 31).

6.1. Caractérisation moléculaire d' *Eutypa* spp.

6.1.1. Génotypage des régions microsatellites par MSP-PCR

Le génotypage a concerné l'ensemble de la collection en testant séparément les deux amorces M13 et (GTG)₅. Les profils obtenus avec l'amorce (GTG)₅ présentent des bandes de très faible intensité ne permettant pas la construction de dendrogramme. Ils ont été donc exclus de l'étude. L'utilisation de l'amorce M13 n'a permis l'obtention d'empreintes génétiques que pour 46 isolats parmi les 60. La visualisation des profils révèle d'importantes variations entre les isolats. Ces différences peuvent s'expliquer par une forte diversité génétique, ou bien une variabilité liée à la méthode d'analyse. En se basant arbitrairement sur un niveau de similarité de 58%, nous distinguons 4 clusters (Fig. 55). En combinant l'analyse numérique avec une comparaison visuelle des empreintes génétiques, 11 isolats ont été sélectionnés à partir des différents clusters, afin de confirmer leurs positionnements phylogénétique et morphologique.

6.1.2. Séquençage et analyse phylogénétique

6.1.2.1. Amplification des ITS

L'amplification de la région ITS à l'aide des amorces universelles ITS1 et ITS4 (White *et al.*, 1990) a généré un fragment unique d'environ 600 pb chez l'ensemble des isolats (Fig. 55).

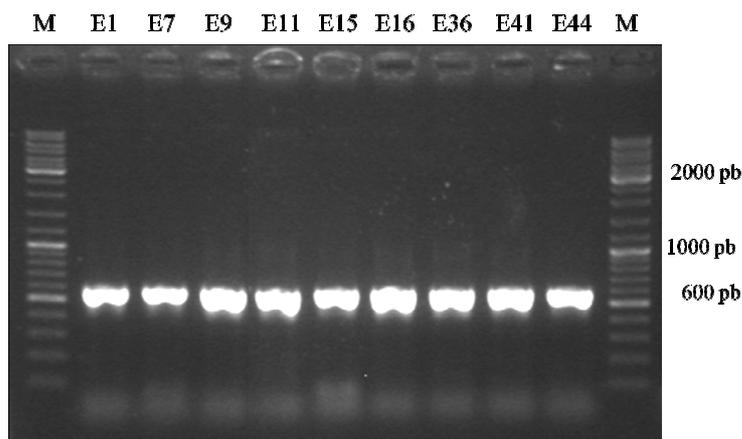


Fig 56: Produits d'amplification de la région ITS des 9 isolats d' *Eutypa* spp. par les amorces ITS1 et ITS4 ; M : marqueur de poids moléculaire (1kb).

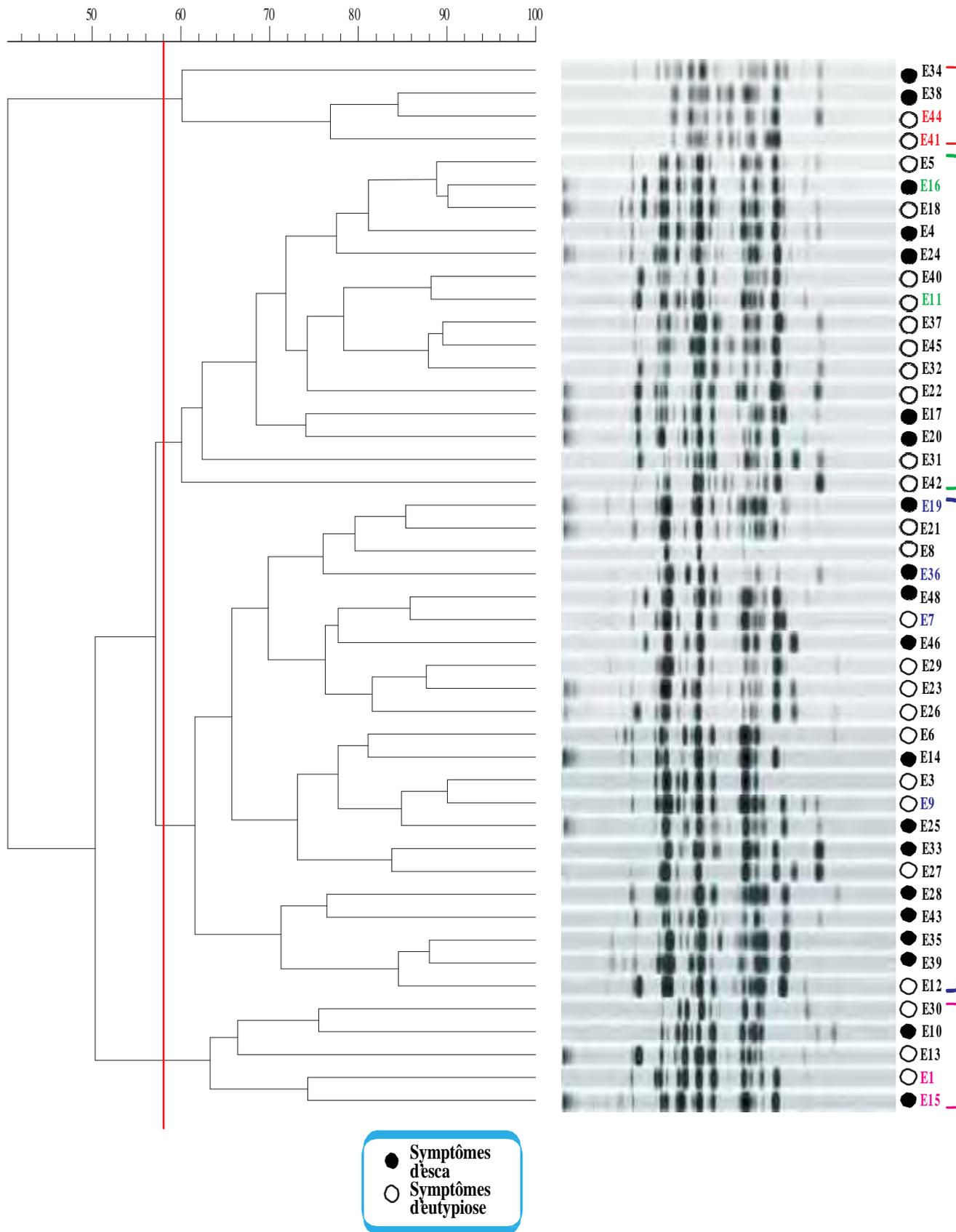


FIG.55: Dendrogramme des profils MSP-PCR obtenus avec l'amorce M13. La ligne verticale correspond au niveau de reproductibilité (58%) à partir de laquelle quatre groupes d'isolats sont déduits. Dans chaque groupe, les isolats mis en évidence en couleur ont été sélectionnés pour l'analyse phylogénétique. Toutes les empreintes génétiques ont été regroupées par similarité en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson et UPGMA. Les isolats obtenus dans cette étude à partir de vignes avec les symptômes d'eutypiose ou d'esca sont indiqués par des cercles blancs et noirs, respectivement.

6.1.2.2. Analyse phylogénétique

L'alignement des séquences ITS de 29 taxa du genre *Eutypa* dont 9 isolats appartenant à cette étude (annexe 6) et 20 taxa obtenus de GenBank, auxquels nous avons inclus un isolat outgroup. L'alignement combiné des 30 isolats se composait de 540 caractères dont 412 étaient constants, 31 ont été variables et peu informatifs pour la phylogénie et 97 ont été informatifs pour l'analyse. L'analyse phylogénétique des ITS a produit 2 arbres de parcimonie maximum ayant une longueur de 200 pas, un indice de cohérence (CI) de 0,785, un indice de rétention (RI) de 0,215 et un indice d'homoplasie (HI) de 0,930. Un des arbres issu de l'analyse de MP est présenté dans la figure 57. Tous les isolats obtenus dans cette étude ont été groupés en clade bien soutenu avec l'espèce *Eutypa lata*, avec un fort support bootstrap (99%) pour les deux analyses (NJ et MP).

6.3. Caractérisation morphologique d' *Eutypa lata*

Sur les aiguilles de pin, des pycnides sous forme de stroma apparaissent agrégées (Fig. 58b,c) et parfois isolées (Fig. 58d,e), Elles sont globuleuses, noirâtres, très nombreuses, disposées sur une seule couche. Elles sont d'un brun foncé à noires, à paroi épaisse. Une fois mûres, elles prennent souvent une forme de globule percé à son sommet d'un ostiole court qui s'ouvre vers l'extérieur libérant des conidies (Fig. 58d-g). Ces dernières ou stylospores sont filiformes, arquées et hyalines (Fig. 58j-l). Elles mesurent (16,9-) 29,8-32,9 (-42,2) x (0,98-) 1,45-1,63 (-25,7) μm . la moyenne et l'écart-type de 50 conidies sont de $31,4 \pm 5,6$ par $1,54 \pm 0,3$. Sur milieu PDA, *Eutypa lata* présente des colonies régulières d'une couleur blanchâtre, d'un aspect cotonneux. Le mycélium est aérien, il devient très dense en vieillissant. Après un mois de culture, il y'a formation de pycnides noirâtres et globuleuses à la surface de la colonie (Fig. 58a). Ces fructifications ne se développent pas chez toutes les cultures. Les taux de croissance enregistrés sur PDA à 25°C varient de 7 à 10 mm après 24 h d'incubation. Un optimum de croissance est atteint à 22°C, un minimum à 10°C et un maximum à 35°C.

Fig. 57 Un des deux arbres phylogénétiques obtenus par maximum de parcimonie à partir des séquences ITS (TL = 200 pas, CI = 0,755, RI = 0,215, HI = 0,930). Les nombres sur les lignes sont les valeurs bootstrap supérieures à 70% avec un rééchantillonnage de 1000 fois. Les espèces présentes en Algérie sont représentées en gras. *Diatrype* spp. a été utilisée comme outgroup.

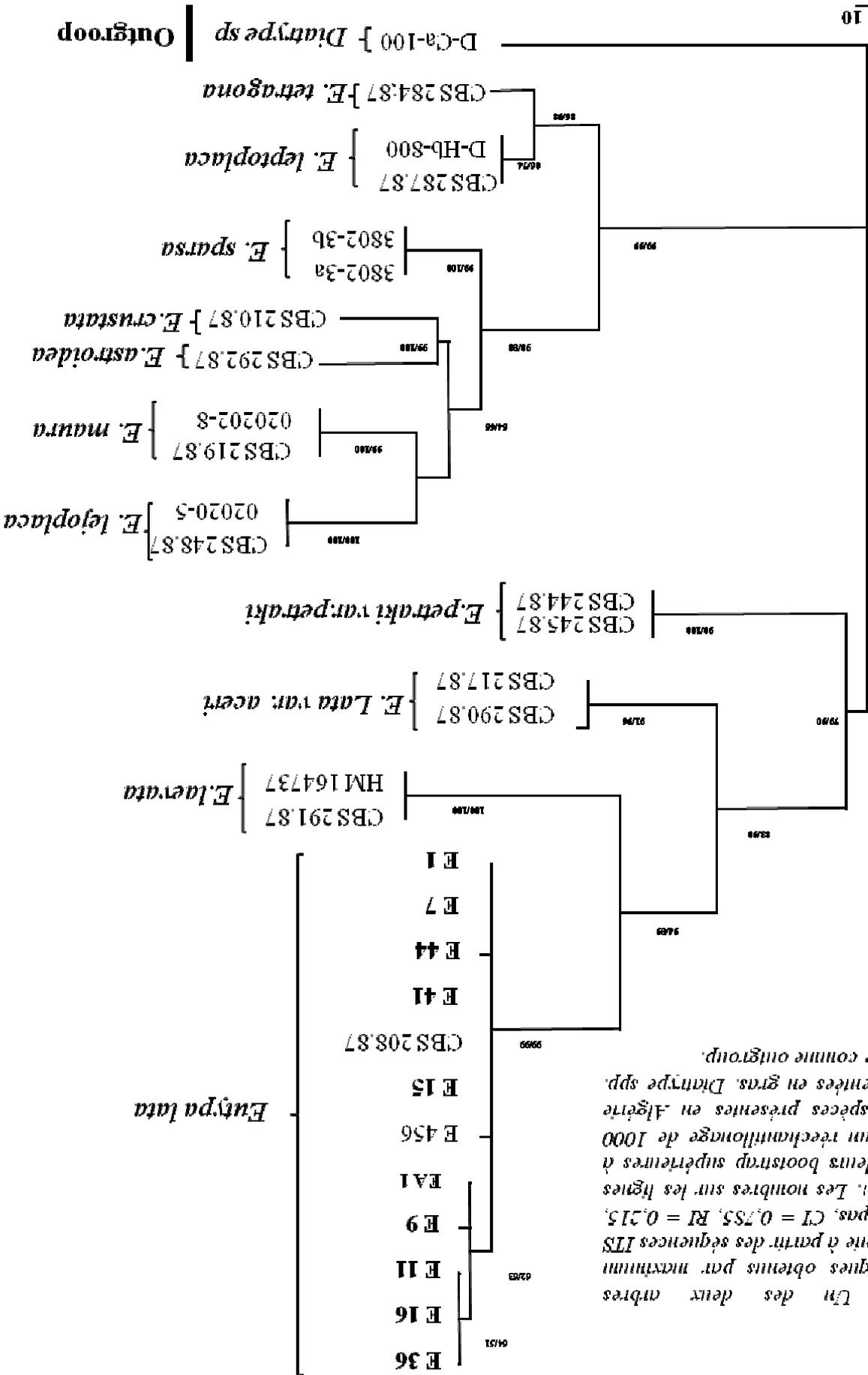




Fig 58. *Eutypa lata*. a. Colonie sur PDA âgée d'un mois. b. c. Pycnides sur aiguilles de Pin. d-g. libération d'une masse de conidies à partir d'une pycnide. h.i. paraphyses. j-l. stylospores. Barres d'échelle. b-e = 0,5 mm. f-g=1mm. h-l = 10µm.

7. Identification de *Fomitiporia* spp.

L'étude a porté sur un total de 23 isolats préalablement identifiés sur la base des caractères morphologiques (Tabl.32). La caractérisation moléculaire de l'ensemble de la collection s'est basée également sur le génotypage par MSP-PCR complété par une analyse phylogénétique des isolats représentatifs de chaque groupe.

7.1. Caractérisation moléculaire de *Fomitiporia* spp.

7.1.1. Détermination du polymorphisme des régions microsatellites par MSP-PCR

Le génotypage par MSP-PCR a été réalisé pour l'ensemble de la collection mais les empreintes génétiques n'ont été obtenues que pour 18. Les deux amorces utilisées (M13) et (GTG)₅ ont donné diverses empreintes génomiques qui apparaissent beaucoup plus complexes avec l'amorce (GTG)₅. La topologie du dendrogramme issu des profils générés avec l'amorce (GTG)₅ est différente de celle obtenue avec l'amorce M13 (Fig. 59 et Fig. 60), respectivement). En effet, à 85% de similarité, le dendrogramme (GTG)₅ est composé de 2 clusters comportant 3 et 8 isolats respectivement et 7 singletons. Toute fois, avec la même similarité, le nombre de clusters obtenu dans le dendrogramme M13 est réduit à 1 seul, composé de 16 isolats et 2 singletons composé individuellement par l'isolats F13 et F16 (Fig. 60). De ce fait, 9 isolats ont été choisis afin de confirmer l'identité de l'ensemble des isolats, par l'analyse phylogénétique et morphologique.

7.1.2. Séquençage et phylogénie

7.1.2.1. Amplification des ITS

L'amplification de la région ITS à l'aide des amorces universelles ITS1 et ITS4 génère un fragment unique d'environ 700 pb pour l'ensemble des isolats du genre *Fomitiporia* (Fig. 61).

M F2 F4 F7 F9 F10 F11 F13 F16 F18 M

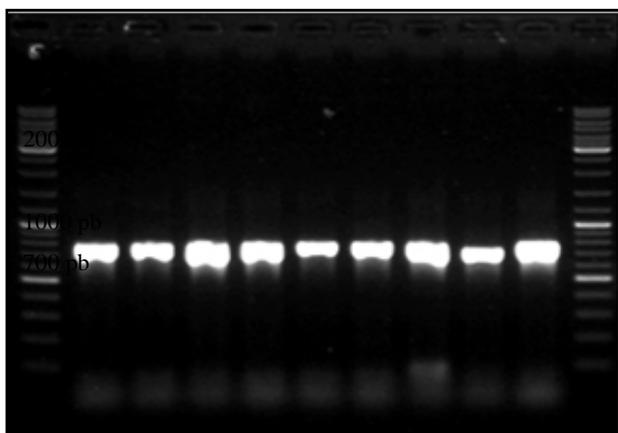


Fig.61. Produits d'amplification de la région ITS des isolats *Fomitiporia* spp. par les amorces ITS1 et ITS4. M : marqueur de poids moléculaire.

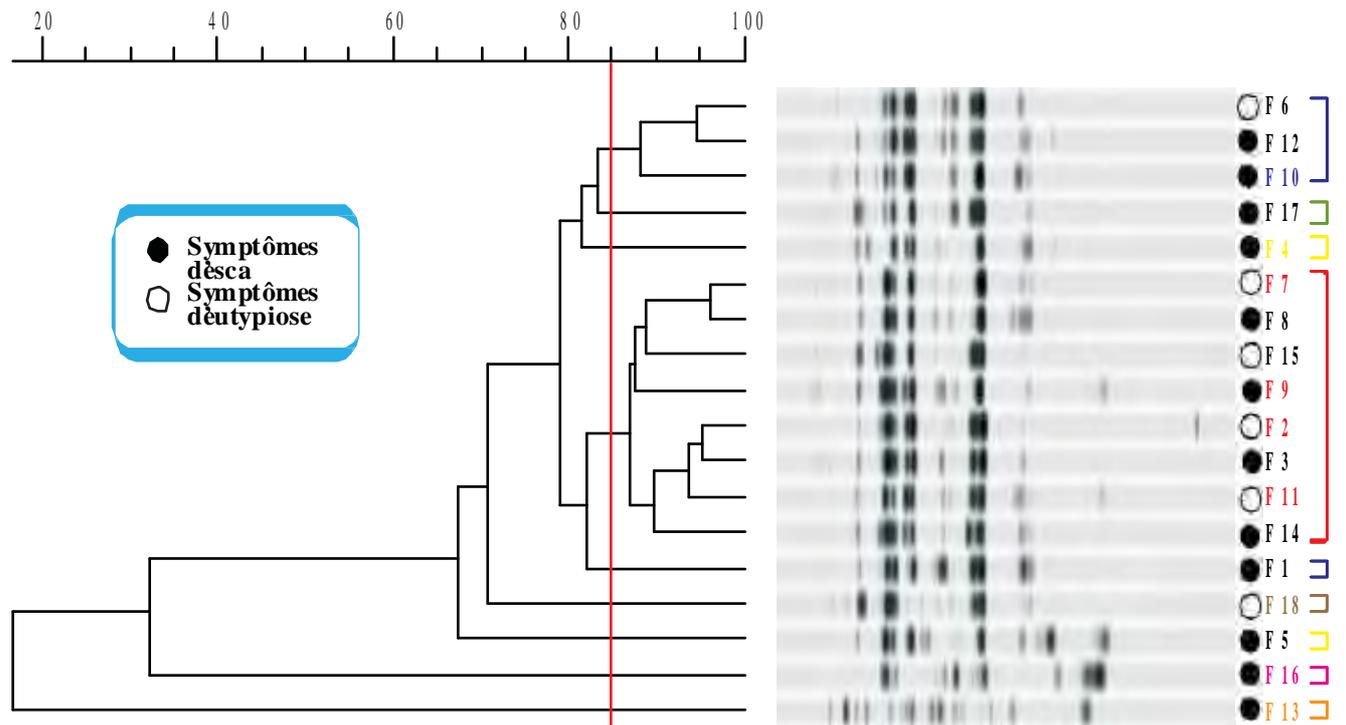


FIG.59: Dendrogramme des profils MSP-PCR obtenus avec l'amorce (GTG)5. La ligne verticale correspond au niveau de reproductibilité (85%) à partir de laquelle neuf groupes d'isolats sont déduits. Dans chaque groupe, les isolats mis en évidence en couleur ont été sélectionnés pour l'analyse phylogénétique. Toutes les empreintes génétiques ont été regroupées par similarité en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson et UPGMA. Les isolats obtenus dans cette étude à partir de vignes avec les symptômes d'eutypiose ou d'esca sont indiqués par des cercles blancs et noirs, respectivement.

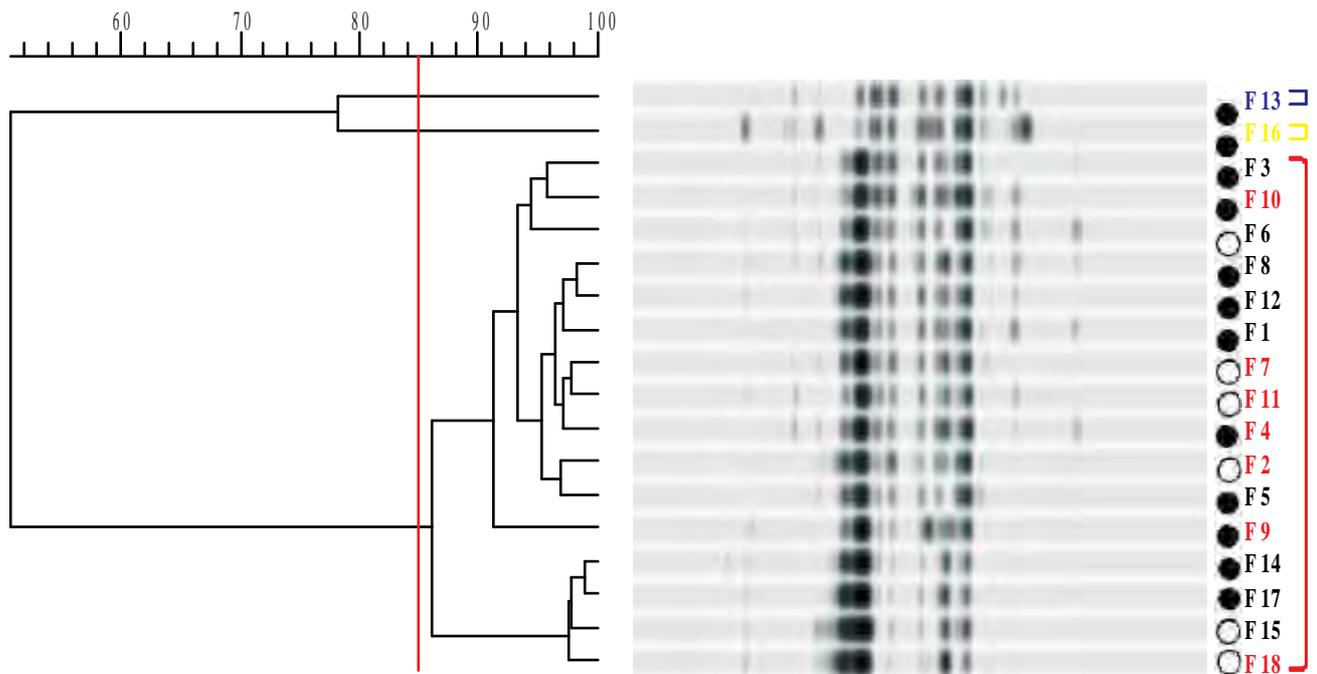


FIG.60: Dendrogramme des profils MSP-PCR obtenus avec l'amorce (M13). La ligne verticale correspond au niveau de reproductibilité (85%) à partir de laquelle trois groupes d'isolats sont déduits. Dans chaque groupe, les isolats mis en évidence en couleur ont été sélectionnés pour l'analyse phylogénétique. Toutes les empreintes génétiques ont été regroupées par similarité en utilisant le coefficient de corrélation de Pearson et UPGMA. Les isolats obtenus dans cette étude à partir de vignes avec les symptômes d'eutypiose ou d'esca sont indiqués par des cercles blancs et noirs, respectivement.

7.1.2.2. Analyse phylogénétique

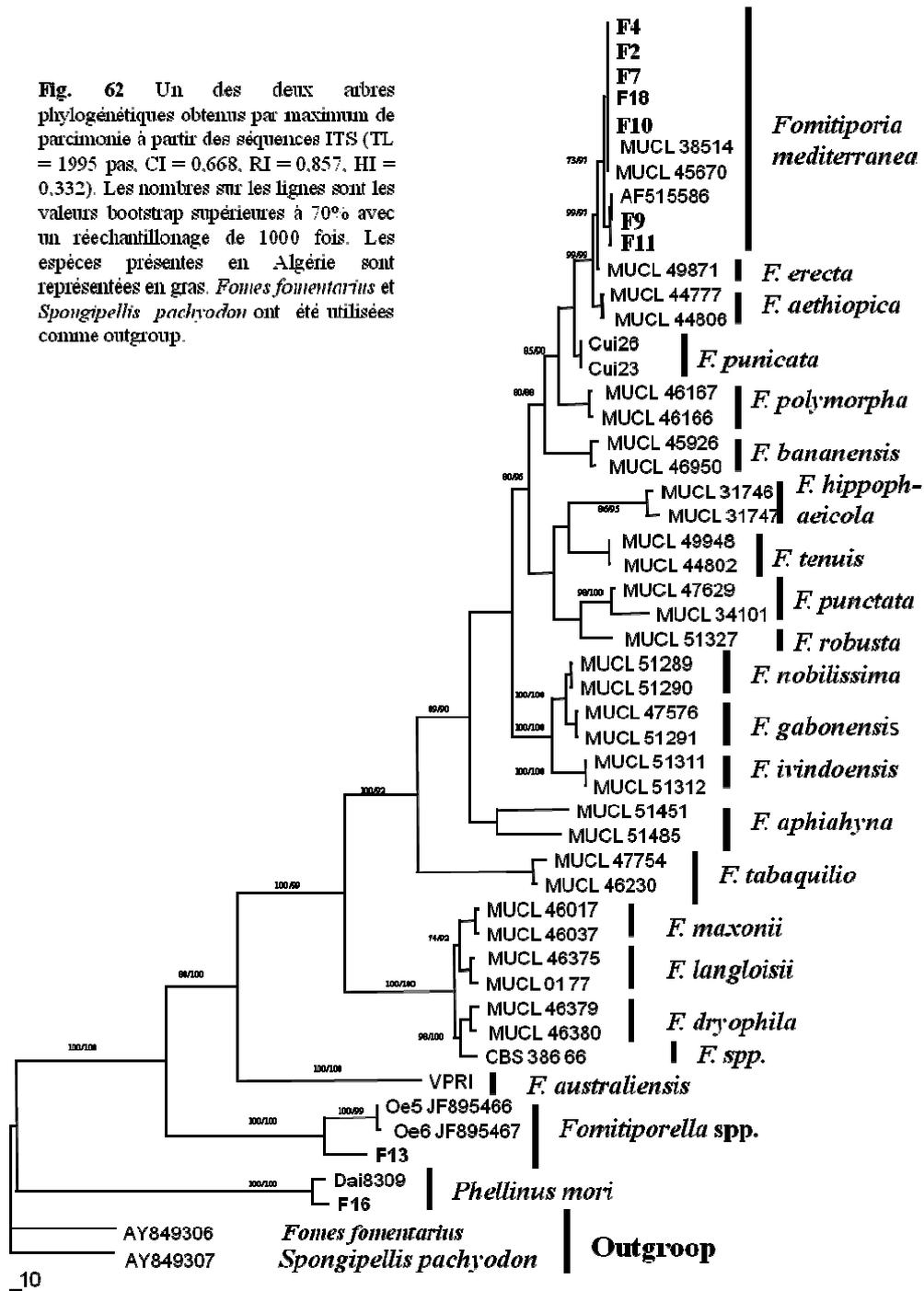
Une première analyse phylogénétique des séquences ITS a été réalisée, en alignant les séquences de cette étude (annexe 6) avec l'ensemble des séquences des espèces du genre *Fomitiporia*. Le résultat de cette première analyse a montré que deux isolats de cette étude ne se regroupent avec aucune espèce du genre *Fomitiporia*. La comparaison des séquences avec celles de la banque génomique NCBI a montré que l'isolat F13 s'apparente à l'espèce *Fomitiporella* spp. avec 95% de similarité. Alors que l'isolat F16 s'apparente avec *Phellinus mori* avec 96% d'homologie. La deuxième analyse phylogénétique a inclut ces deux espèces. Ainsi, l'analyse a contenu 40 taxa retirés de GenBank, 9 isolats de cette étude et 2 outgroup. L'alignement combiné des 51 taxa se composait de 952 caractères. Parmi eux, 22 ont été constants, 109 ont été variables et peu informatifs pour la phylogénie et 621 ont été informatifs pour l'analyse de parcimonie. L'analyse phylogénétique a produit deux arbres ayant une longueur de 1995 pas, un indice de cohérence (CI) de 0,668, un indice de rétention (RI) de 0,857 et un indice d'homoplasie (HI) de 0,332. Un des arbres issu de l'analyse de MP est présenté dans la figure 62. Des 9 taxa caractérisés, 7 s'apparentent fortement à l'espèce *Fomitiporia mediterranea*. Ce groupe est bien supporté statistiquement avec 99% d'homologie pour les deux analyses (NJ et MP).

7.3. Caractérisation morphologique de *Fomitiporia mediterranea*, *Phellinus mori* et *Fomitiporella* spp.

Les trois espèces, telles que déterminées par l'analyse phylogénétique, sont morphologiquement similaires. Étant donné que ces champignons ne forment pas de fructification en culture, seuls les diamètres des colonies ont été mesurés.

Sur milieu PDA, les colonies sont circulaires à pourtour régulier. Elles sont blanches au départ, puis deviennent ocre. Le mycélium est aérien, présentant un aspect velouté et mamelonné ; les colonies se développent rapidement. Elles atteignent un diamètre de 7 à 11 mm après 24h d'incubation à 25°C sur PDA. Un optimum de croissance est atteint à 25°C, un minimum à 10°C et un maximum à 40°C.

Fig. 62 Un des deux arbres phylogénétiques obtenus par maximum de parcimonie à partir des séquences ITS (TL = 1995 pas, CI = 0,668, RI = 0,857, HI = 0,332). Les nombres sur les lignes sont les valeurs bootstrap supérieures à 70% avec un rééchantillonnage de 1000 fois. Les espèces présentes en Algérie sont représentées en gras. *Fomes fomentarius* et *Spongipellis pachyodon* ont été utilisées comme outgroup.



CHAPITRE IV. DISCUSSIONS

CHAPITRE IV. DISCUSSION

I. Epidémiologie et répartition spatio-temporelle de l'eutypiose et de l'esca

Les résultats des enquêtes sur le terrain ont confirmé la présence des deux principales maladies de dépérissement de la vigne : l'eutypiose et l'esca.

Les observations réalisées pendant trois années consécutives (2006/2007/2008) ont montré la présence des symptômes typiques de l'eutypiose et de l'esca dans les dix vignobles prospectés. Les symptômes observés lors des enquêtes réalisées le mois de mai de chaque année, se sont manifestés sous forme de nécroses ou un rabougrissement du feuillage sur toutes les parties herbacées ou uniquement sur un seul bras du cep. Ce genre de symptômes a été décrit, comme étant des symptômes typiques aux attaques de l'eutypiose particulièrement, dans les travaux de Carter et Moller, (1977) ; Sosnowski et *al.* (2009) et Kuntzmann et *al.* (2010).

Les symptômes observés lors des enquêtes réalisées le mois de juillet- août de chaque année, ont été attribués au syndrome de l'esca. Ils se sont manifestés sous la forme lente, caractérisée par des marbrures ou tigrures au niveau du feuillage et un flétrissement ou un dessèchement des grappes. La forme apoplectique s'est caractérisée par une mort soudaine des ceps souvent chargés de fruits, manifestations déjà signalées par Berraf et Peros (2005) lors des enquêtes réalisées dans différentes régions viticoles de l'Algérie et observées dans les vignobles à travers le monde (Mugnai et *al.*, 1999; Edwards et *al.*, 2001; Stamp, 2001; Quaglia et *al.*, 2009).

La mortalité des coursons a été constatée chez certains ceps, dont le reste de la végétation se développait normalement. A ces symptômes, s'ajoute une mortalité assez importante dans certaines parcelles, se traduisant par des ceps complètement dépéris. Ce constat a déjà été rapporté par Mur et Branias, (1991) ; Mugnai et *al.* (1999) ; Berraf et Peros (2005) ; Péros et *al.* (2008) et White et *al.* (2011) dans différents vignobles à travers le monde.

Dans la présente étude, les basidiocarpes n'ont pas été trouvés sur les ceps durant les trois années d'observation, contrairement à ce qui a été signalé en Europe, où ils sont rencontrés sur les troncs morts (Mugnai et *al.*, 1999 et Kassemeyer, 2003). Fisher (2006) et Amalfi et *al.* (2010) ont signalé leur présence sur d'autres essences ou sur les piquets de palissage en bois qui pourraient être une source d'inoculum pour les vignobles de proximité.

L'étude épidémiologique conduite sur trois années, par le suivi de 5000 ceps repartis au niveau des dix parcelles, a permis d'évaluer la répartition, la fréquence et l'intensité de l'expression des symptômes foliaires de l'eutypiose et de l'esca. Ces enquêtes pluriannuelles

ont permis de répondre objectivement à la question de la progression de ces maladies du bois, dans les différents vignobles prospectés, et d'approcher la gravité réelle de ces maladies. Aussi, il a été montré que les ceps infectés ne développaient pas les symptômes foliaires de façon systématique et régulière et un cumul sur plusieurs années est nécessaire (Péros, 1999 ; Surico *et al.*, 2000; Luque *et al.*, 2009).

Les prospections ont donc révélé des taux de dépérissement pouvant être très importants. L'ensemble des parcelles voient leurs taux d'expression des symptômes de dépérissement augmenter d'année en année. Ainsi, les taux d'eutypiose pour l'année 2006, varient de 2,8% à 21%, selon les parcelles, soit un taux moyen de 11,5%. En 2007, ce taux a atteint 13,8% et en 2008, les valeurs oscillaient entre 9,8% et 19%, soit une moyenne de 13,5%. Les symptômes typiques de l'esca ont été aussi observés dans toutes les parcelles avec des taux allant de 0,4% à 4,4%. Le taux moyen d'expression dans l'ensemble des parcelles pour l'année 2006, est de l'ordre de 1,9%. Il est de 3,1% pour l'année 2007 et 4,4% pour l'année 2008. En revanche, les valeurs enregistrées en 2007 et 2008 ne reflètent pas l'état sanitaire réel des parcelles, puisque les parcelles les plus atteintes ont été arrachées, soit durant la deuxième ou la troisième année de prospection. Cela signifie que les taux des différents symptômes de dépérissement auraient été beaucoup plus importants que ceux enregistrés durant les années 2007 et 2008.

Ces résultats montrent que les taux d'expression de l'eutypiose au niveau des différentes parcelles restent beaucoup plus importants, comparés à ceux de l'esca. Ils corroborent avec ceux déjà enregistrés par Berraf et Peros (2005) à partir des diverses régions viticoles de l'Algérie. L'importance de l'eutypiose a été aussi signalée en Espagne (Luque *et al.*, 2009) où les taux ont atteint 58% contre seulement 16% pour l'esca. En revanche, les enquêtes réalisées en France et l'Italie ont souligné l'ampleur des symptômes d'esca aux vignobles comparés à ceux de l'eutypiose (Mugnai *et al.*, 1999 ; Marchi *et al.*, 2006 et Peros *et al.*, 2008).

La présence des bras morts au niveau des ceps a été observée dans toutes les parcelles avec de larges fluctuations de fréquences allant de 0,4 à 14% pour l'année 2006. En 2007, nous avons noté une baisse du taux cumulé qui passe de 4,8% à 3,5% pour atteindre 2,6% en 2008. D'après Dumont (2007), Cette baisse du taux de ceps avec des bras morts s'explique sans doute, par l'élimination de ces derniers lors de la taille hivernale. Nous avons également constaté que les bras morts au niveau des ceps sont observés dans la plupart des parcelles où le taux d'expression des symptômes d'eutypiose est important. Cette mortalité apparait principalement due à l'eutypiose, confirmant les observations de Munkvold *et al.* (1994) et Péros (1999). Ce constat a été également confirmé par la suite par les travaux de Berraf et

Peros (2005) qui ont montré une corrélation significative entre la mortalité des coursons et les symptômes de rabougrissements dus à l'eutypiose.

Ces maladies de dépérissement sont associées à une mortalité déjà très élevée dans certaines parcelles. Pour l'ensemble des parcelles observées, le pourcentage moyen calculé pour les 5000 ceps est de 27,5% en 2006. Cela signifie que plus d'un quart des vignes était absent. En dépit de l'arrachage des parcelles les plus touchées en 2008, la mortalité a atteint les 30%. Selon Mugnai *et al.* (1999) et Peros *et al.* (2008), L'esca doit contribuer de façon non négligeable à la progression de la mortalité, sachant que les ceps atteints d'apoplexie ont peu de chances de récupérer la saison suivante.

Par ailleurs, nous signalons que le taux de mortalité ainsi que l'importance de l'eutypiose et de l'esca varient énormément d'une parcelle à l'autre. Cette variabilité dans l'expression des symptômes pourrait s'expliquer par des niveaux d'entretien différents des parcelles ; ou suite à un stress répété ou des conditions particulières dans quelques parcelles ; la diversité de l'historique parcellaire, pourrait également expliquer cette variabilité dans cette expression bien que les parcelles se trouvaient dans le même environnement, plantées avec le même matériel végétal et durant la même année. Une telle situation a été déjà décrite dans d'autres vignobles à travers le monde pour l'eutypiose (Péros, 1995 ; Highet et Wicks, 1998 et Berraf et Péros, 2005) et l'esca (Cortesi *et al.*, 2000 et Berraf et Péros, 2005).

Les incidences de l'eutypiose et de l'esca qui traduisent l'importance réelle de ces maladies aux vignobles, varient d'année en année. En général, des tendances similaires ont été observées pour les deux maladies dans l'ensemble des parcelles. Nous avons observé une hausse du taux des ceps expressifs de l'eutypiose et de l'esca ; ainsi les incidences de l'eutypiose passent de 16,06% en 2006 à 18,22% en 2008. Pour l'esca, nous avons enregistré des incidences plus faibles que celles de l'eutypiose; néanmoins, elles ont pratiquement doublées pour chacune des années de prospection (2,8% en 2006, 4,4% en 2007 et 7,5% en 2008). La comparaison des incidences pour chacune des parcelles permet de constater la progression des deux maladies d'année en année. Une étude réalisée en France a montré de faibles incidences de l'eutypiose, 1,97% des ceps étaient touchés en 2007 contre 1,27% en 2006. Quant aux incidences de l'esca, en 2007, 4,79% de ceps étaient touchés contre 3,79% en 2006 (Cassagnes, 2008). Les enquêtes réalisées en Algérie par Berraf et Péros (2005) ont montré des incidences qui varient de 1,4% à 49,4% pour l'eutypiose. Une situation similaire a été retrouvée aussi en Australie, où certaines parcelles ont montré des taux qui varient de 1,6% à 46,2% (Highet et Wicks, 1998).

Concernant l'esca, Berraf et Péros (2005) ont enregistré des incidences qui varient de 5,8% à 28,1%, selon les parcelles. Aussi, Cortesi *et al.*, (2000) ont signalé que dans certaines régions méditerranéennes, plus de 50% des vignobles ont une incidence qui varie de 20 à 30%. Par ailleurs, ces taux restent supérieurs à ceux enregistrés dans la présente étude et la situation paraît moins grave comparativement à d'autres parcelles où l'incidence de l'esca était comprise entre 9,93% et 49,09% (Surico *et al.*, 2000).

Un certain nombre de relations possibles entre le climat et l'expression des symptômes ont été déjà élucidées. En effet, une augmentation de l'incidence des maladies a été associée au nombre d'événements de pluie qui se sont déroulés durant la période de la taille (Sosnowski *et al.*, 2005 et 2011). De même, Sosnowski *et al.* (2007) et Lecomte *et al.* (2008) ont signalé une augmentation de l'incidence des symptômes foliaires associés à des précipitations hivernales importantes et ont suggéré que la disponibilité accrue de l'eau peut faciliter le transport de toxines au niveau du feuillage au printemps. Ces données pourraient expliquer l'augmentation de plus de 3% enregistrée en 2007 pour l'incidence de l'eutypiose et pratiquement 2% pour celle de l'esca, suite aux précipitations qui ont atteint les 443,3 mm dans notre région d'étude, durant les mois de Novembre et Décembre, qui correspondent à la période de la taille, comparé à l'année 2006 où seulement 182,3 mm ont été enregistrés durant cette même période. En 2008, une légère baisse de l'incidence de l'eutypiose a été enregistrée (lorsque l'ensemble des parcelles est considéré), ce qui coïncide avec la diminution des précipitations hivernales (248,8 mm), comparées à celles de l'année 2007. Néanmoins, il est difficile de cerner le rôle du climat sur l'expression des différents symptômes de dépérissement.

L'étude de la dynamique spatio-temporelle des données épidémiologiques, a permis d'analyser la structure du développement de l'eutypiose, de l'esca et de la mortalité dans l'ensemble des parcelles pendant les années de prospections. Les résultats obtenus ont montré que l'eutypiose est la principale maladie du bois en expression des symptômes et en nuisibilité dans les différentes parcelles ; c'est aussi l'une des principales causes de la mortalité observée durant les années d'expérimentation. Toutefois, la mortalité des ceps sains est considérée non négligeable et explique environ le tiers de la mortalité globale. En revanche, l'implication de l'esca dans la mortalité est de moindre importance, et les symptômes n'ont qu'une incidence limitée sur la mortalité. Selon Larignon (2012), la mortalité résulte de l'action d'agents pathogènes qui sont impliqués dans les différentes maladies de dépérissement et qu'il était possible d'observer la mort des vignes sans qu'il y ait

expression de symptômes sur la partie herbacée et qu'à l'intérieur de tels ceps, des nécroses peuvent être trouvées.

Les tests statistiques de l'analyse du nombre de liens utilisée pour l'étude de l'association spatiale de la mortalité et l'expression des symptômes d'eutypiose et d'esca, a montré une répartition aléatoire des ceps morts ou malades. Toutefois une agrégation a été notée dans certaines parcelles, pour les ceps eutypiés mais limitée au cep directement voisin sur le rang. Des analyses de la distribution des ceps qui présentent des symptômes d'esca ont montré que les ceps infectés sont repartis au hasard dans certains vignobles en Italie (Surico *et al.*, 2000 ; Sofia *et al.*, 2006 et Marchi *et al.*, 2006) tandis qu'une agrégation des ceps malades a été détectée dans d'autres vignobles (Pallastro *et al.*, 2000). En ce qui concerne la répartition spatiale de l'eutypiose, aucune donnée n'est disponible permettant d'affirmer ou au contraire d'infirmer les résultats obtenus dans la présente étude.

II. Identification des agents pathogènes impliqués dans le dépérissement de la vigne

Différentes nécroses ont été trouvées dans les troncs et les bras des ceps qui montrent les symptômes typiques de l'eutypiose et de l'esca. Elles sont identiques à celles décrites par Mugnai *et al.* (1996), Péros *et al.* (2008) et White *et al.* (2011). Quelque soit leur type, ces nécroses ont été beaucoup plus rencontrées dans les troncs qu'au niveau des bras. Ce résultat est corroboré par la baisse du taux de ceps qui montrent des bras morts lors des trois années de prospection. Contrairement aux travaux de Luque *et al.* (2009), les nécroses ont été beaucoup plus trouvées au niveau des bras qu'au niveau des troncs. En fait, il est largement admis que les agents fongiques pathogènes associés au dépérissement de la vigne pénètrent dans les ceps par les blessures de la taille annuelle (Carter, 1988 ; Surico *et al.*, 2006 et Van Niekerk *et al.*, 2006). Néanmoins, une étude réalisée par Larignon *et al.* (2006) met en évidence la présence d'agents fongiques au niveau de la soudure du greffage et des plaies à la base du plant. Ces niveaux sont suspectés d'être des voies de contamination et les champignons se propagent principalement par le matériel végétal. Dans notre cas, leur faible présence au niveau des bras, pourrait s'expliquer par l'élimination de ces derniers durant la taille hivernale.

Quant à la relation entre les symptômes externes des ceps et les nécroses trouvées dans le bois, nous avons constaté que leur nombre est sensiblement le même entre les ceps qui montrent les symptômes typiques de l'eutypiose et ceux de l'esca.

Pour l'ensemble des ceps examinés, le type de nécrose le plus rencontré est la nécrose brune et dure en position sectorielle, suivie par la nécrose claire et tendre toujours en position

sectorielle. Des résultats similaires ont été trouvés en Espagne (Luque et *al.*, 2009), en Californie (Urbez-Torres, 2011a) et en Australie (Sosnowski et *al.*, 2005). Selon ces auteurs, ce type de nécrose est caractéristique de l'eutypiose, bien que les ceps qui ont présenté les symptômes typiques de l'esca ont eux aussi présenté le plus souvent ce type de nécrose. En France et en Italie, la nécrose la plus commune est la nécrose centrale (brune et dure et claire et tendre), caractéristique de l'esca (Larignon et Dubos, 1997 ; Péros et *al.*, 2008 et Mugnai et *al.*, 1999).

Plusieurs types de nécroses ont été observés sur l'ensemble des coupes réalisées pour un même cep. Ceci s'explique sans doute par la coexistence de plusieurs maladies dans un même cep.

A partir des nécroses des troncs et les bras de ceps dépérissants, plusieurs espèces fongiques ont été isolées; ainsi, une collection de 368 isolats a été constituée dont le nombre d'isolats qui proviennent des ceps eutypiés est beaucoup plus important que celui des ceps qui montrent de l'esca. Ces données viennent confirmer l'importance de l'eutypiose évaluée sur le terrain, lors des années de prospection.

Sur la base d'une identification morphologique préliminaire, nous avons déterminé, par ordre d'importance: *Phaeomoniella* spp., des *Botryosphaeriaceae*, *Phaeoacremonium* spp., *Eutypa* spp. et *Fomitiporia* spp. Cette microflore est identique à celles déjà décrites en Algérie (Berraf et Péros, 2005), en Europe (Larignon et Dubos, 1997 ; Péros et *al.*, 1999 ; Fischer et Kassemeyer, 2003 et Phillips et *al.*, 2005), en Afrique du Sud (White et *al.*, 2011) et en Californie (Urbez-Torres et *al.*, 2011b).

Une relation entre les lésions vasculaires des ceps de vigne et les agents fongiques isolés a été mise en évidence. Ces agents pathogènes ont des localisations différentes dans les nécroses :

Les *Botryosphaeriaceae* sont surtout isolées à partir des nécroses sectorielles et très peu rencontrées au niveau des nécroses centrales et des ponctuations. Urbez-Torres et *al.* (2011b) ont également isolé les *Botryosphaeriaceae* à partir des nécroses sectorielles. Leur présence dans la plupart des nécroses s'explique, selon Larignon, (1991) par leur capacité à se développer dans le bois sain sans avoir un effet appréciable sur celui-ci. Ou encore, par le fait qu'ils soient des envahisseurs tardifs de la colonisation du bois. Quant à Ferreira et *al.*, (1998) ils suggèrent l'hypothèse d'une colonisation primaire du bois par ces champignons. Selon Phillips, (2002) et Urbez-Torres (2011a), les *Botryosphaeriaceae* sont des saprophytes et parmi eux, ceux qui sont pathogènes pour la vigne. Van Niekerk et *al.* (2011) ont montré

l'implication des espèces de cette famille, dans le dépérissement de la vigne en Afrique du Sud ; elles ont été isolées à partir des nécroses brunes et dures en position sectorielle. Ces espèces ont été également isolées des nécroses claires et tendres et même à partir de ceps asymptomatiques ; ce qui confirme la nature saprophyte des *Botryosphaeriaceae* qui peuvent aussi être présents à l'état endophyte.

Les *Eutypa* spp. sont isolées des nécroses dures et tendres en position sectorielle. Nous remarquons leur absence au niveau des nécroses brunes en position centrale et des punctuations. Ce résultat confirme ceux déjà obtenus par Bolay et Moller, (1977) ; Péros et Berger, (1994), et Berraf et Péros (2005) qui montrent que l'espèce *Eutypa lata*, agent causal de l'eutypiose, provoque une nécrose brune sectorielle caractéristique de la maladie. Sa présence au niveau de la nécrose tendre s'explique par le fait que le bois soit colonisé par le champignon de la seconde séquence parasitaire, qui transforme le bois brun en un bois de couleur claire à consistance tendre. Une telle évolution dans la dégradation du bois a été aussi, signalée par Larignon et Dubos, (1997). Ils estiment qu'*Eutypa lata* intervient dans les premières étapes de la colonisation du bois, d'où son rôle de pionnier dans le syndrome de l'esca.

Les isolats de *Phaeoconiella* spp. ont été obtenus à partir de toutes les nécroses, plus particulièrement de la nécrose sectorielle et des punctuations situées à la périphérie des nécroses. Les *Phaeoacremonium* spp. sont isolées à partir de toutes les nécroses, ils sont rencontrés à une fréquence assez importante au niveau de la nécrose sectorielle. De nombreux auteurs ont montré que ces espèces causent des détériorations au niveau du bois, produisant des nécroses brunes. Aussi ils sont présents au niveau des punctuations qui se trouvent à la périphérie de pratiquement toutes les nécroses et dans le liseré, ce qui explique le taux élevé de leur isolement (Jameaux-Déspréaux *et al.*, 1997 ; Gatica *et al.*, 2000 ; Van Niekerk *et al.*, 2011). Il convient aussi de noter, que ces champignons interviennent au cours des toutes premières étapes de la colonisation du bois. D'où leur rôle de pionniers dans la maladie de l'esca (Ferreira *et al.*, 1994 ; Chiarappa, 2000).

Les *Fomitiporia* spp. sont isolées plus particulièrement de la nécrose claire en position centrale et sectorielle. Par contre, elles sont rarement présentes dans les nécroses brunes et absentes au niveau des punctuations. En particulier *Fomitiporia mediterranea* est une espèce responsable de la dégradation du bois en amadou, comme l'ont suggéré de nombreux auteurs (Chiarappa, 1959, 1997, 2000 ; Mugnai *et al.*, 1999 ; Cortesi *et al.*, 2000 a). Cette espèce

intervient dans la dernière étape de la colonisation du bois, même si Sparapano *et al.*, (2000) ont pu démontrer qu'elle est capable de coloniser le bois seule.

La complexité des pathosystèmes vigne-esca et vigne-eutypiose, montre clairement la nécessité d'identifier, sans équivoque, la composante fongique afin de permettre une meilleure compréhension de l'étiologie de ces maladies et justifier la mise en place de stratégies de contrôle de ces agents fongiques.

Les marqueurs phénotypiques seuls s'avèrent souvent insuffisants pour une discrimination fiable des espèces, d'où la nécessité d'utiliser des marqueurs moléculaires qui se révèlent particulièrement utiles chez les espèces où les différences morphologiques sont subtiles ou ambiguës (Trouillas *et al.* 2010 et Urbez-Torres, 2011).

En vue d'une première approche globale de caractérisation taxonomique de l'ensemble des isolats obtenus, nous avons choisi d'utiliser une méthode de génotypage par la technique MSP-PCR (Microsatellite-Primed PCR), qui a permis d'analyser la diversité génétique et d'organiser chacun des genres en groupes homogènes selon leurs empreintes génétiques. Elle s'est révélée utile dans le typage moléculaire des isolats ; certaines études ont porté sur son application dans l'identification des espèces de bactéries (Valerio, 2008) et des champignons (Abd-Elsalam *et al.*, 2010) montrant que cette méthode a un grand potentiel comme outil de diagnostic. Elle a également été utilisée avec succès, pour la caractérisation des espèces des genres *Phaeoconiella* et *Phaeoacremonium* (Alves *et al.*, 2004) et des espèces de la famille des *Botryosphaeriaceae* (Abdollahzadah *et al.*, 2009). Dans la présente étude, nous avons testé deux types d'amorces, le microsatellite M13 et le minisatellite (GTG)₅, qui se sont avérés très efficaces pour obtenir des empreintes génétiques très distinctes. Toutefois, la capacité de chaque amorce à produire des empreintes génétiques discriminatoire diffère pour chaque genre. Les dendrogrammes obtenus avec l'amorce M13 ont permis le regroupement des isolats jusqu'au niveau de l'espèce, pour les genres *Phaeoacremonium* et *Fomitiporia*. En revanche, chez les *Botryosphaeriaceae*, le dendrogramme obtenu avec l'amorce M13 n'a pas permis une bonne résolution des profils génétiques. Un meilleur génotypage a été obtenu avec l'amorce (GTG)₅ qui a permis de clairement différencier entre les espèces de cette famille.

Les six dendrogrammes des profils MSP-PCR obtenus avec l'amorce M13 et (GTG)₅, ont permis de regrouper les isolats en grappes clairement définies. Ainsi, une sélection d'isolats représentatifs de chaque groupe a été réalisée afin de déterminer la position taxonomique et phylogénétique de chacun d'eux. Le séquençage partiel de plusieurs gènes choisis de manière spécifique pour chacun des genres (ITS, β -tubuline, actine, facteur d'élongation 1- α) a été

réalisé. Six arbres phylogénétiques, exprimant les relations évolutives entre les séquences, ont été érigés. Les isolats de la présente étude ont été groupés en clades bien soutenus avec des espèces de référence trouvées dans la banque publique GenBank (NCBI).

Les analyses phylogénétiques et morphologiques ont mis en évidence l'implication, dans ces pathosystèmes, de 15 espèces décrites pour la première fois en Algérie et qui appartiennent à différents genres :

Quatre espèces appartenant au genre *Phaeoacremonium* ont été identifiées sur la base des séquences des gènes de la β -tubuline et de l'actine, à savoir : *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeoacremonium parasiticum*, *Phaeoacremonium venezuelense* et *Phaeoacremonium hispanicum*.

Phaeoacremonium aleophilum est l'espèce la plus fréquemment isolée, avec une incidence de 68,8% de tous les isollements. Cette espèce est reconnue comme étant la plus commune sur la vigne à travers le monde (Mostert et al, 2006b; Essakhi et al, 2008; Gramaje et al, 2009) et est le plus souvent associée à des symptômes foliaires de l'esca (Larignon et Dubos, 1997 ; Essakhi et al, 2008, Peros et al, 2008).

Phaeoacremonium parasiticum et *Phaeoacremonium venezuelense* ont été isolées à des fréquences sensiblement similaires. *Phaeoacremonium parasiticum* est bien connue sur les vignes et a été isolée à des fréquences relativement élevées. Elle est aussi trouvée sur d'autres plantes hôtes ligneuses comme agent endophyte ou pathogène (Mostert et al., 2006b). *Phaeoacremonium parasiticum* est l'espèce la plus commune causant des infections chez l'humain. Elle a d'abord été signalée en 1974 sous le nom de *Phialophora parasitica* (Ajello et al., 1974).

Il est important de signaler la présence d'une telle proportion de *Phaeoacremonium venezuelense* parmi les espèces identifiées. Cette espèce a rarement été rencontrée sur la vigne et est représentée dans le monde entier par seulement cinq isolats, dont trois étaient isolés des infections de l'homme, le quatrième était issu d'une vigne et le cinquième isolat d'un hôte inconnu (Guarro et al, 2006.). *Phaeoacremonium venezuelense* a d'abord été décrite comme *Cephalosporium serrae* dans un premier rapport médical impliquant des espèces de *Phaeoacremonium* (De Albornoz, 1974).

Phaeoacremonium hispanicum a été récemment décrite (Gramaje et al., 2009) et a jusqu'à présent été trouvée seulement en Espagne. Cette espèce a la capacité de croître à 37 ° C, ce qui suggère qu'elle ait le potentiel pour survivre à la température du corps humain. Cette constatation est très intéressante par rapport à l'écologie de *Phaeoacremonium parasiticum* et *Phaeoacremonium venezuelense*, car ces espèces thermotolérantes sont associées aux

phaeohyphomycoses chez l'humain, mais ont également été isolées à partir des vignes et d'autres plantes hôtes ligneuses (Mostert et al., 2006a). Selon ces auteurs, les infections chez l'humain par les espèces *Phaeoacremonium* semblent devenir plus fréquentes au cours des deux dernières décennies. Essakhi et al. (2008) ont isolé des espèces de *Phaeoacremonium* précédemment associées à des infections humaines à partir des bras et des troncs de *Vitis vinifera* qui présentent des symptômes d'esca. Toutefois, l'importance clinique de *Phaeoacremonium hispanicum* reste à déterminer.

L'étude des caractéristiques morphologiques et culturales a été utile pour une identification préliminaire des *Phaeoacremonium* spp. *Pm aleophilum* se distingue par le pigment jaune diffusé dans le milieu de culture et des conidiophores courts et non ramifiés, alors que *Pm parasiticum* se distingue par la présence de gouttelettes d'exsudats sur le mycélium, des conidiophores ramifiés et une croissance radiale intermédiaire entre *Pm aleophilum* et *Pm venezuelense*. *Pm hispanicum* se distingue de toutes les espèces de *Phaeoacremonium* déjà décrites, par la présence de phialides courts latéraux qui se rajeunissent.

Ces espèces ont montré une variabilité dans l'aspect cultural des colonies et dans la taille des conidies. Toutefois, les mensurations des conidies de chaque espèce sont comparables à celles déjà décrites (Mostert et al., 2006a et Gramaje et al., 2009).

Phaeomoniella chlamydospora est la seule espèce appartenant au genre *Phaeomoniella* identifiée sur la base des séquences ITS. Elle a été isolée à partir des ceps atteints d'esca et d'eutypiose. Ce champignon est impliqué dans le syndrome de l'esca et est associé à la maladie de Petri, un dépérissement touchant les jeunes vignes (Graniti et al., 2000). Péros et al. (1999) indiquent également sa présence dans les ceps manifestant des symptômes d'eutypiose. Dans le cas de l'esca, il jouerait un rôle pionnier en favorisant l'installation de *Fomitiporia mediterranea* (Larignon et Dubos, 1997). *Phaeomoniella chlamydospora* pourrait pénétrer de plusieurs manières dans les ceps, mais elle pourrait être aussi un endophyte se révélant pathogène en cas de stress (Gubler et al., 2004). En Australie, *P. chlamydospora* est trouvé dans la plupart des vignes exprimant des symptômes de la maladie de Petri et d'esca (Edwards et Pascoe, 2004). En revanche, *P. aleophilum* est rarement rencontré et uniquement dans la région la plus chaude. Les auteurs suggèrent que *P. aleophilum* serait plus agressif en climat chaud du fait d'une température optimale de croissance *in vitro* élevée (35 °C) et supérieure à celle de *P. chlamydospora* (25 °C). La fréquence importante de *P. aleophilum* en Algérie comparativement à certains vignobles septentrionaux comme la Champagne et l'Alsace en France, pourrait donc s'expliquer par un effet climatique (Larignon et al., 2009).

Six espèces appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae* ont été identifiées sur la base des séquences des ITS et du gène du facteur d'élongation de traduction EF-1 α , à savoir : *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodiasp.*, *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum australe*, *Neofusicoccum mediterraneum* et *Botryosphaeria dothidea*. Ces espèces ont été associées aux symptômes d'eutypiose et d'esca. *Neofusicoccum parvum* et *Diplodia seriata* ont été les plus fréquemment isolées (54,8% et 37,5%, respectivement).

Diplodia seriata et *Neofusicoccum parvum* sont des espèces fréquentes dans les ceps atteints d'esca (Larignon et Dubos, 1997; Armengol *et al.*, 2001) et d'eutypiose (Ferreira *et al.*, 1989; Péros *et al.*, 1999); elles contribuent de manière importante au dépérissement des vignes. *Diplodia seriata* a été signalée comme étant l'espèce la plus répandue des *Botryosphaeriaceae*, dans toutes les régions viticoles, du fait de son optimum de croissance compris entre 10 et 40°C (Urbez-Torres, 2011a). Elle a été également signalée en Italie, au Chili et au Liban comme agent causal du Black Dead Arm (maladie de dépérissement de la vigne décrite pour la première fois par Lehoczyen 1974 en Hongrie et dont l'agent causal était *Diplodia mutila*). Larignon *et al.* (2001) ont repris ce terme pour désigner des dépérissements causés par *Diplodia seriata* et *Botryosphaeria dothidea* en France. Par ailleurs, ces espèces ont été fréquemment isolées à partir de différentes lésions vasculaires de la vigne à travers le monde (Van Niekerk *et al.*, 2004; Urbez-Torres *et al.*, 2006 et Luque *et al.*, 2009). Cependant elles n'ont jamais été associées aux symptômes foliaires caractéristiques du BDA, décrits par Larignon *et al.* (2001) en France. Afin de lever toute ambiguïté, Urbez-Torres, (2011a) propose de garder la dénomination de « Black Dead Arm » uniquement pour les ceps qui hébergent *Diplodia mutila*.

Neofusicoccum parvum est une espèce commune sur les plantes hôtes ligneuses, y compris de nombreuses espèces de *Vitis*, *Actinidia* et *Populus*. Sur les vignes, *N. parvum* est un pathogène virulent (Van Niekerk *et al.*, 2004; Slippers *et al.*, 2007a,b et Urbez-Torres *et al.*, 2011a). Récemment, Gramaje *et al.* (2012) ont isolés *N. parvum* à partir d'amandier présentant des symptômes de dépérissement.

L'espèce *Botryosphaeria dothidea* a été faiblement isolée, elle constitue 4,8% de l'ensemble des *Botryosphaeriaceae* obtenus dans cette étude. Cette espèce est pathogène et cause de nombreux dégâts sur une large gamme d'hôtes (Slippers *et al.*, 2007a et Lazzizeira *et al.*, 2008). Sur la vigne, *B. dothidea* est associée à *D. seriata* et *N. parvum* (Armengol *et al.*, 2001 et Aroca *et al.*, 2006). En Grèce, *B. dothidea* est la seule espèce responsable du dépérissement

de l'olivier (Phillips *et al.*, 2005), tandis qu'elle est accompagnée de *N. vitifusiforme* et *N. australe*, en Espagne (Moral *et al.*, 2010).

Un seul isolat a été obtenu pour chacune des espèces *N. mediterraneum* et *N. australe*. Cette dernière a été souvent impliquée dans le dépérissement des vignes en Afrique du Sud ; sa virulence a été confirmée par des tests de pathogénéités (Van Niekerk *et al.*, 2004 et White *et al.*, 2011). Récemment en Espagne, Martin *et al.* (2011) ont identifié *N. mediterraneum* et *N. australe* sur la vigne. Dans la description de *N. australe*, la taille des conidies était de (18 à 19,5) x (6,4 à 6,8) μm (Lazzizeira *et al.*, 2008), alors qu'elles sont plus longues et plus fines chez l'isolat de la présente étude. Aussi, il est important de signaler l'absence du pigment jaune, caractéristique de l'espèce. L'isolat de *N. mediterraneum* possède des conidies plus petites par rapport à celles de l'espèce type (Crous *et al.*, 2007).

Un seul isolat s'est regroupé dans le clade des espèces du genre *Lasiodiplodia*, entre *L. citricola*, identifiée récemment en Iran, sur *Citrus* spp. (Abdollahzadeh *et al.*, 2009) et *L. parva*, isolée à partir de rameaux dépéris de peuplier (Alves *et al.*, 2008). Sur le plan morphologique, les trois espèces ne sont pas discriminables ; néanmoins, elles se distinguent par la taille des conidies. Les conidies de *Lasiodiplodia* sp. sont plus petites que celles de *L. citricola*, mais plus grandes par rapport à celles de *L. parva*.

Différentes espèces des *Botryosphaeriaceae* peuvent être isolées à partir d'un même symptôme vasculaire montrant divers symptômes foliaires, seuls ou avec d'autres agents pathogènes. En Afrique du Sud, Van Niekerk *et al.* (2004) identifient 11 espèces associées à la vigne et montrent à l'aide d'inoculations artificielles qu'elles sont capables, à des degrés divers, d'infecter la vigne. Les espèces de *Botryosphaeriaceae* gagnent en importance en tant qu'agents pathogènes de la vigne. A ce jour, 21 espèces des *Botryosphaeriaceae* sont connues pour se produire chez la vigne (Phillips, 2002, Phillips et Alves, 2009 et Urbez-Torres, 2011a).

L'analyse phylogénétique des ITS du genre *Eutypa* a permis d'identifier une seule espèce « *Eutypa lata* agent de l'eutypiose. Elle a été isolée des nécroses sectorielles mais aussi en bordure de l'amadou. Cela confirme son implication dans la formation de la nécrose sectorielle brune et dure (Carter, 1991) et son rôle de pionnier dans l'esca (Larignon et Dubos, 1997). *E. lata* n'a été trouvé que dans 31,4 % des ceps montrant des symptômes que nous avons attribués à l'eutypiose. Cette fréquence apparaît faible comparativement à une autre étude réalisée dans le Sud de la France qui indique une fréquence d'isolement de 79,6 % dans un échantillon de 113 ceps (Péros *et al.*, 1999). Une première hypothèse est qu'*E. lata* n'était

pas le seul responsable de la mortalité des coursons observée en Algérie. Cette dernière possibilité est retenue par Ferreira *et al.* (1989) et Van Niekerk *et al.* (2011) pour expliquer l'absence d'*E. lata* dans des échantillons prélevés en Afrique du Sud. Aussi, dans une étude réalisée récemment en Californie par Urbez-Torres *et al.* (2011b), *Eutypa lata* a été très peu isolée à partir de la nécrose sectorielle, comparé aux *Botryosphaeriaceae*, à *Diatrypella* spp. et à *Phomopsis viticola*. Selon ces auteurs, des tests de pathogénéicité sont nécessaires afin de déterminer les espèces fongiques capables de reproduire les symptômes internes et externes de l'eutypiose sur la vigne.

Enfin trois espèces appartenant aux Basidiomycètes ont été identifiées sur la base des séquences ITS, à savoir : *Fomitiporia mediterranea*, *Phellinus mori* et *Fomitiporella* spp. Une étude réalisée en Afrique du Sud (White *et al.*, 2011) a montré l'implication de dix espèces appartenant aux basidiomycètes, dans la pourriture blanche du bois des ceps qui présentent des symptômes d'esca. *Fomitiporia mediterranea* est l'espèce la plus rencontrée dans les ceps dépérissants. Sa présence en Algérie montre qu'elle n'est pas spécifique à l'Europe, comme a été rapporté par Larignon (2012). Selon ce dernier auteur, les Basidiomycètes responsables de la pourriture blanche sont propres aux zones où ils sont trouvés. *Fomitiporia mediterranea* est spécifique à l'Europe, *Fomitiporia polymorpha* a été isolée en Californie, *Fomitiporia australiensis* en Australie et *Fomitiporella vitis* au Chili. Selon cet auteur, cette répartition assez localisée suggère une propagation de ces espèces par le matériel végétal.

Les données recueillies au cours de cette étude vont dans le sens de la littérature, soulignant la difficulté d'un diagnostic fiable des maladies du bois sur le terrain. Cette difficulté réside dans la complexité d'associer la symptomatologie foliaire avec les différents agents fongiques isolés à partir des lésions vasculaires. Des études complémentaires semblent nécessaires pour préciser le rôle de ces agents fongiques dans la dégradation du bois et sur l'évolution des dépérissements au vignoble.

CONCLUSIONS-PERSPECTIVES

CONCLUSIONS-PERSPECTIVES

Le travail présenté dans cette thèse a permis de mettre la lumière sur l'importance de l'eutypiose, de l'esca et du dépérissement de manière générale, dans différents vignobles prospectés. C'est une contribution à la compréhension plus complète du comportement de ces pathosystèmes dans la région de Tipaza. Les objectifs de cette étude étaient de suivre l'expression des symptômes foliaires d'année en année, d'évaluer les dégâts de l'eutypiose et de l'esca sur les vignes, et d'identifier les agents pathogènes associés au bois malade dans ces vignobles.

Afin de limiter les sources de variations et faciliter le traitement des données, il a été choisi de travailler sur des parcelles situées dans une même région, plantées la même année avec le même cépage. Le suivi sur trois années d'observation a permis d'étudier l'évolution des symptômes externes sur les ceps classés sains ou malades et de mettre en évidence, le caractère très fluctuant de la symptomatologie de l'esca et l'eutypiose. Toutefois, la comparaison des incidences pour chacune des parcelles a permis de constater la progression de ces maladies d'année en année. Cette progression régulière, durant ces dernières années, a été aussi signalée dans des vignobles de par le monde.

L'étude des interactions entre les symptômes externes, les nécroses du bois et les agents pathogènes a conduit à la mise en évidence de relations très complexes dans ces pathosystèmes. Plusieurs agents pathogènes coexistent dans un même cep et chacun entraîne une lésion particulière du bois. Cette cooccurrence des symptômes internes et leurs agents pathogènes associés est fréquente et les relations entre les symptômes externes et les lésions internes sont souvent ambiguës. Ce qui rend le diagnostic de terrain de ces maladies du bois difficile où seuls les symptômes externes sont pris en compte.

L'étude de la dynamique spatio-temporelle des données épidémiologiques, a permis d'analyser la structure du développement de l'eutypiose, de l'esca et de la mortalité dans l'ensemble des parcelles pendant les années de prospections. Les méthodes d'analyses spatiales ont été utilisées pour répondre à la question de la répartition des ceps atteints et comment évolue le dépérissement dans les parcelles. Aussi, elles ont permis de connaître le devenir des ceps ayant présentés des symptômes d'eutypiose et d'esca et de connaître l'origine de la mortalité en comparant l'historique de chaque cep durant les années d'étude.

A travers les résultats obtenus, l'eutypiose reste la principale maladie du bois en expression des symptômes et en nuisibilité dans nos vignobles. C'est aussi l'une des principales causes de la mortalité observée durant les trois années. En revanche, le développement de l'esca devient de plus en plus marqué, au fil du temps.

Nous avons pu établir à l'aide de méthodes d'isolement appropriées, une collection de 368 isolats issus de différentes lésions vasculaires, rencontrées dans le tronc et les bras de 200 ceps examinés. La caractérisation morphologique de ces agents fongiques s'est avérée insuffisante à elle seule pour une discrimination fiable des espèces. Nous avons montré au cours de la présente étude, l'utilité des techniques moléculaires pour l'identification, sans équivoque, des espèces incriminés dans le dépérissement de la vigne.

Le génotypage par la technique MSP-PCR de notre collection d'isolats, nous a donné un schéma préliminaire et simplifié des relations phylogénétiques des espèces identifiées. Une classification hiérarchique *via* la méthode UPGMA a été réalisée sur la base des empreintes génétiques. Ainsi, la MSP-PCR est estimée comme étant une technique très fiable et rapide pour l'étude de plusieurs individus en même temps.

Les analyses phylogénétiques, après un séquençage partiel de plusieurs gènes choisis de manière spécifique pour chacun des genres (ITS, β -tubuline, actine, facteur d'élongation 1- α) nous ont révélé la présence de 15 espèces appartenant à 10 genres fongiques. Ces résultats mettent clairement en évidence une importante diversité fongique, pouvant potentiellement être présente en complexe dans le bois des ceps de vigne. Ils signalent également ces espèces pathogènes, pour la première fois dans les vignobles prospectés. Néanmoins, les causes qui peuvent expliquer l'expression des symptômes foliaires de l'esca restent en grande partie à identifier. En effet, ces deux maladies sont la résultante de phénomènes qui sont rendus complexes par le nombre d'agents pathogènes impliqués et également par la cohabitation d'autres maladies au vignoble.

La caractérisation des pathosystèmes vigne-eutypiose et vigne-esca est donc loin d'être terminée, et sa poursuite devrait encore dévoiler de nombreuses connaissances scientifiques intéressantes à la fois en mycologie et dans la lutte contre les maladies du bois.

L'importance de l'eutypiose, de l'esca et de la mortalité dans le vignoble du sahel algérien, révélée par cette étude, justifie la mise en place d'enquêtes plus importantes qui concernerait l'ensemble des zones de production de la vigne en Algérie avec un plus grand nombre de parcelles choisies de manière aléatoire. Ces enquêtes permettraient d'évaluer de manière plus précise l'impact des dépérissements et éventuellement d'identifier les facteurs de risques.

Pour une meilleure compréhension des dépérissements de la vigne, il est nécessaire d'impliquer les facteurs susceptibles d'influencer ces maladies, afin de dégager un ensemble de pratiques à adopter pour éviter leur développement. L'intérêt de la prophylaxie est clairement démontré, en l'absence de traitements efficaces contre ces maladies. Il est donc, indispensable de limiter les sources d'inocula, en éliminant les ceps atteints d'apoplexie ou de nécroses, les ceps dont les bras présentent des symptômes d'eutypiose ou d'esca, en les brûlant. Il faudrait limiter le nombre et les dimensions des plaies de taille ; aussi, il serait judicieux d'adapter la fertilisation afin de maîtriser la vigueur des ceps ; il faudrait également, restaurer les souches par recepage ou greffage. Dans l'immédiat, des opérations de vulgarisation doivent être réalisées auprès des viticulteurs, afin de les prévenir du danger que font peser les maladies de dépérissement sur la pérennité de leurs vignobles.