

# Epidémiologie du *Phytophthora* de l'Aulne



Stage pré-optionnel réalisé à l'INRA de Nancy au sein de l'équipe d'écologie des champignons pathogènes forestiers, dans le cadre de la deuxième année de la formation de l'ENITA de Clermont-Ferrand



**Thomas SCORDIA**  
Promotion 2007 – 2010  
Juillet-Août 2009

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Monsieur Frédéric LAPEYRIE, Président du Centre INRA de Nancy, qui m'a accueilli au sein de son établissement en tant que stagiaire.

Je remercie sincèrement mon maître de stage, Monsieur Claude HUSSON, Ingénieur d'études à l'INRA, qui m'aura consacré beaucoup de temps au cours de mes 6 semaines de stage ainsi que sur la correction de mon rapport de stage.

Je tiens aussi à remercier Jaime AGUAYO, doctorant à l'INRA, pour le temps qu'il m'a consacré pour répondre à mes questions concernant le *Phytophthora alni* et pour l'aide qu'il m'a apporté lors des manipulations de laboratoire. Je tiens également à le remercier pour avoir continué mon travail "au pied levé" lorsque ma période de stage s'est terminée.

Enfin, un grand merci au reste de l'équipe d'écologie des champignons pathogènes forestiers pour l'accueil chaleureux qu'elle m'a octroyé durant ces 6 semaines de stage.

# Sommaire

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>1. PRESENTATION DE L'ORGANISME D'ACCUEIL : L'INRA</b> .....	<b>2</b>
1.1 L'INRA EN FRANCE.....	2
1.2 L'INRA EN LORRAINE .....	2
1.3 EQUIPE D'ÉCOLOGIE DES CHAMPIGNONS PATHOGENES FORESTIERS.....	4
1.4 POURQUOI L'INRA ? .....	5
<b>2. PRESENTATION DU CONTEXTE</b> .....	<b>5</b>
2.1 PRESENTATION DE L'AULNE GLUTINEUX.....	5
2.2 PRESENTATION DE <i>PHYTOPHTHORA ALNI</i> .....	6
<b>3. PRESENTATION DU STAGE : EPIDEMIOLOGIE DE <i>PHYTOPHTHORA ALNI</i></b> .....	<b>11</b>
3.1 AVANT-PROPOS .....	11
3.2 OBJECTIFS.....	12
3.3 METHODOLOGIE .....	12
3.4 RESULTATS ET CRITIQUES.....	17
<b>4. ACQUIS PERSONNELS</b> .....	<b>18</b>
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>19</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>20</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>21</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>22</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b> .....	<b>23</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX</b> .....	<b>23</b>
<b>TABLE DES PHOTOGRAPHIES</b> .....	<b>23</b>
<b>LISTE DES ANNEXES</b> .....	<b>24</b>

## Introduction

L'aulne glutineux est une essence largement répandue dans les ripisylves qui présente un grand intérêt comme fixateur de berges. Seulement depuis environ 20 ans, il est touché par un agent pathogène nommé *Phytophthora alni* qui provoque chez lui son dépérissement ainsi que sa mort.

La maladie est présente dans de nombreux pays européens dont la France, celle-ci étant fortement touchée sur de nombreux bassins versants : Rhin-Meuse, vallée du Thouet (79), Sèvre Niortaise...

Le bassin de la Sèvre Niortaise est exposé depuis peu au pathogène ce qui soulève de nombreuses questions notamment concernant la gestion des peuplements d'aulnes sur le marais Poitevin. Une étude menée par l'Institut Interdépartemental du Bassin de la Sèvre Niortaise a vu le jour cette année afin de faire l'état des lieux de la maladie et de proposer des modalités de gestion des ripisylves.

Cette étude intéresse fortement l'équipe d'écologie des champignons pathogènes forestiers de l'INRA de Nancy qui étudie le *Phytophthora* et en particulier les conditions d'émergence du pathogène. En effet l'INRA a besoin d'en savoir plus sur l'écologie du *Phytophthora* pour comprendre comment la maladie a pu émerger récemment. Pour cela l'INRA doit constituer une collection d'isolats de *Phytophthora alni* qui lui permettra d'une part de connaître la niche écologique et le caractère indigène ou exotique de cet agent et d'autre part d'étudier la structure génétique de ses populations. Ainsi, l'étude du bassin de la Sèvre Niortaise, où l'état sanitaire des arbres sera cartographié par placette d'observation et où de nombreux prélèvements d'écorces d'aulnes malades pour l'isolement de *P. alni* seront effectués, constitue une excellente contribution à cet objectif global.

Mon rôle dans ces études intervient au niveau de l'analyse des échantillons d'aulnes puisque j'étais chargé d'isoler et d'identifier *Phytophthora alni* sur les échantillons provenant du bassin de la Sèvre Niortaise.

Afin de présenter mon stage, le rapport se décomposera en quatre parties. Dans une première partie sera présenté l'organisme dans lequel j'ai réalisé mon stage à savoir : l'INRA. Puis, dans une seconde partie, le contexte dans lequel se déroule le stage sera présenté avant d'exposer le travail que j'ai réalisé sur l'épidémiologie de l'aulne. Enfin dans la dernière partie sera consacré à la présentation de mes acquis personnels de cette période au sein du centre de recherche.

## 1. Présentation de l'organisme d'accueil : l'INRA

### 1.1 L'INRA en France

L'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) est un organisme de recherche scientifique publique créé en 1946 dans un contexte de reconstruction nationale d'après-guerre et du projet de modernisation de l'agriculture française. Cet organisme, sous la double tutelle du ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche et du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, a accompagné depuis, les changements de l'agriculture, des filières alimentaires et des territoires dans un but de répondre aux attentes sociétales, en particulier, celle de la suffisance alimentaire nationale.

Aujourd'hui les enjeux ont bien changés et sont passés au niveau mondial : nutrition humaine, environnement, changement climatique, valorisation des territoires, compétition entre cultures alimentaires et non alimentaires, épuisement des ressources fossiles, maladies émergentes... Ces défis, l'INRA essaye d'y apporter des solutions afin d'obtenir pour la société une alimentation saine, et de qualité, une agriculture compétitive et durable ainsi qu'un environnement préservé et valorisé. Le travail de l'INRA s'oriente ainsi autour de 5 grandes missions :

- "produire et diffuser des connaissances scientifiques",
- "concevoir des innovations et des savoir-faire pour la société",
- "éclairer, par son expertise, les décisions des acteurs publics et privés",
- "développer la culture scientifique et technique et participer au débat science/société",
- "former à la recherche et par la recherche".

L'INRA est un pôle scientifique d'excellence et est le premier institut de recherche agronomique en Europe. Par ailleurs, cet institut est situé au deuxième rang mondial pour les publications scientifiques dans les domaines de l'agriculture, du végétal et de l'animal.

L'INRA est un centre ouvert que ce soit sur le monde scientifique puisqu'il entretient des partenariats scientifiques et des collaborations dans le monde entier avec de nombreux centres de recherches scientifiques, universités... ou sur la société puisqu'il entretient des partenariats avec de multiples collaborateurs : acteurs socio-économiques, collectivités territoriales, pouvoirs publics.

Afin de répondre aux attentes de la société, L'INRA possède un dispositif scientifique important réparti dans 14 départements scientifiques et 20 centres régionaux :

- 1 800 chercheurs,
- 2 400 ingénieurs,
- 4 200 techniciens,
- 1 800 thésards,
- 1 000 chercheurs étrangers accueillis chaque année,
- 1 900 stagiaires accueillis chaque année.

Enfin pour l'année 2007, le budget de l'INRA était de 800,5 M€ dont 59,7€ liés aux reports de l'exercice précédent.

### 1.2 L'INRA en Lorraine

L'INRA s'est implanté en 1961 en Lorraine dans une région marquée historiquement par la recherche forestière, la recherche agronomique et laitière ainsi que la recherche en microbiologie.

Les grandes lignes de la recherche scientifique lorraine ont ainsi été tracées à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle et ont permis d'orienter les thématiques actuelles de recherche du centre qui sont au nombre de trois :

- Forêts : écologie fonctionnelle, environnement et produits,
- Transferts, sécurité et qualité dans la chaîne alimentaire
- Agriculture économe et autonome pour le développement durable des territoires

### 1.2.1 Les structures et les hommes

Le centre de Nancy est formé de 8 départements de recherche :

- Écologie des forêts, prairies et milieux aquatiques (EFPA)
- Caractérisation et élaboration des produits issus de l'agriculture (CEPIA)
- Sciences pour l'action et le développement (SAD)
- Sciences sociales, agriculture et alimentation, espace et environnement (SAE2)
- Physiologie animale et systèmes d'élevage (PHASE)
- Alimentation humaine (ALIMH)
- Environnement et agronomie (EA)
- Microbiologie et chaîne alimentaire (MICA)

Ces 8 départements sont représentés par 13 unités :

- 7 Unités Mixtes de Recherche en collaboration avec les universités et l'ENGREF (UMR) :
- 1 unité sous contrat (USC)
- 2 unités de recherches propres à l'INRA (UR)
- 1 unité expérimentale (UE)
- 2 unités d'appui à la recherche (UAR)

Ces 13 unités sont les suivantes :

- ASTER : Agrosystèmes Territoires, Ressources
- BEF : Biogéochimie des Écosystèmes Forestiers
- EEF : Écologie et Écophysiologie Forestières
- EFPA : Écologie des Forêts, Prairies et milieux Aquatiques
- IAM : Interactions Arbre-Microorganismes
- LAE : Laboratoire Agronomie et environnement
- LEF : Laboratoire d'Économie Forestière
- LERFOB : Laboratoire d'Étude des Ressources Forêt-Bois
- LGM : Laboratoire de Génétique et Microbiologie
- LSE : Laboratoire Sols et Environnement
- SDAR : Services Déconcentrés d'Appui à la Recherche
- UEFL : Unité Expérimentale Forestière Lorraine
- URAFPA : Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux

Enfin une communauté de recherche de près de 500 personnes, répartie dans l'ensemble des unités, est constituée de:

- 220 agents INRA,
- 120 enseignants-chercheurs,

- 50 agents non-permanents
- Et de plus de 100 stagiaires

### 1.2.2 Partenariat

Le centre de recherche de Champenoux favorise depuis de longue date le partenariat que ce soit au niveau local, régional, national, ou international. Différents types de partenariats ont été mis en place :

- **Partenariats scientifiques** : FABELOR, pôle fibre, NFZ.forestnet...
- **Partenariats socio-économiques** : avec l'ONF, les organisations de la forêt privée, les industriels de la filière forêt-bois, de l'agroalimentaire et de l'environnement, les organismes de développement agricole...
- **Partenariats avec les universités et les écoles** : INPL, UHP, Nancy2, AgroParisTech-ENGREF, Ecoles doctorales RP2E, BioSE, SJPEG

### 1.3 Equipe d'écologie des champignons pathogènes forestiers

L'équipe d'écologie des champignons pathogènes forestiers qui m'a accueilli appartient à l'unité mixte de recherche (UMR) Interactions Arbres-microorganismes. Cette équipe est composée de 10 agents permanents : 3 scientifiques, 2 ingénieurs d'études, 4 techniciens, 1 gestionnaire, et 4 doctorants.

L'objectif de l'équipe est de déterminer les facteurs contribuant aux émergences de maladies fongiques dans les écosystèmes naturels et forestiers. Elle étudie les facteurs liés à l'apparition de nouveaux pathotypes d'agents pathogènes ainsi que ceux liés au développement d'épidémies dues à des agents qui ne posaient pas ou peu de problèmes auparavant.

Ainsi l'équipe étudie les phénomènes suivants sur les maladies forestières :

- Les processus de dispersion des agents pathogènes qui conditionnent les flux de gènes,
- L'évolution des populations d'agents pathogènes qui ont pu conduire à l'émergence du pathogène,
- Les modifications environnementales (climat, dépôts anthropiques d'azote, modification dans la conduite des peuplements forestiers).

L'unité de pathologie forestière étudie également l'impact des maladies sur les populations d'arbres et les conséquences des maladies émergentes sur les populations hôtes.

Les recherches du laboratoire s'orientent ainsi autour de 5 grandes thématiques :

- **Processus de dispersion des agents pathogènes** : L'objectif de cette thématique est de caractériser la dispersion à l'aide des outils de la génétique des populations ainsi que de coupler des approches d'épidémiologie et d'écologie moléculaire.
- **Evolution des populations d'agents pathogènes** : Il s'agit ici de mettre en évidence l'évolution sous pression de sélection exercée par la plante-hôte ainsi que l'évolution par hybridation interspécifique.
- **Impact des modifications environnementales** : l'unité réalise une recherche empirique des facteurs d'évolution de l'incidence des maladies ainsi que l'analyse des mécanismes de ces modifications.
- **Impact des maladies sur les populations d'arbres.**

- Conséquences pour la gestion des écosystèmes : l'unité établit des cartes de risques comme outil d'aide à la décision et recherche également des résistances durables chez des essences particulières touchées par des agents pathogènes.

Actuellement l'unité de pathologie forestière travaille principalement sur 4 thèmes :

- la rouille du peuplier,
- la maladie de l'aulne glutineux due à *Phytophthora alni*,
- la maladie du frêne due à *Chalara fraxinea*,
- l'impact du changement climatique sur les agents pathogènes forestiers

## 1.4 Pourquoi l'INRA ?

Au cours de mon BTS Gestion Forestière, j'ai réalisé en 2005 une étude sur l'identification des zones de dépérissement de l'aulne glutineux sur le bassin versant de la vallée du Thouet (Deux-Sèvres) dans le cadre d'une problématique de renouvellement de ripisylves. Durant les 3 mois et ½ de mon stage, j'ai découvert, sur le terrain, le *Phytophthora* de l'aulne et ses conséquences sur cette essence. L'étude de ce pathogène sur le terrain m'a fortement intéressée seulement il me manquait une partie dans l'étude du *Phytophthora* pour que celle-ci soit complète : la partie laboratoire. En effet, lors de l'étude, quelques échantillons d'aulnes présentant des symptômes caractéristiques avaient été envoyés à l'équipe d'écologie des champignons pathogènes forestiers pour mettre en évidence ou non la présence du *Phytophthora alni* mais l'identification n'avait pas été faite par mes soins. Par conséquent je n'ai pas pu connaître la partie laboratoire.

Le choix du thème de stage pré-optionnel étant libre mais en lien avec notre année de spécialisation, il m'a paru judicieux de continuer de travailler et de découvrir ce pathogène qui m'avait tant intéressé lors de mon étude de BTS, non plus sur le terrain mais au laboratoire.

Il n'existe qu'un centre de recherche en France qui étudie *Phytophthora alni* à savoir l'INRA de Nancy. Voilà pourquoi j'ai souhaité réaliser mon stage au sein de cet établissement.

Par ailleurs, les stages sont pour moi l'occasion de découvrir diverses structures qui sont de potentielles futures employeuses. Je me fais ainsi une idée des lieux où je pourrais exercer plus tard. Le centre de recherche était un organisme que je n'avais pas encore eu l'occasion de découvrir au cours de mon parcours scolaire et que j'ai eu l'opportunité de découvrir au cours du stage pré-optionnel

## 2. Présentation du contexte

### 2.1 Présentation de l'aulne glutineux



L'aulne glutineux ou *Aulus glutinosa* appartient à la famille botanique des Bétulacées. Son aire naturelle s'étend de l'Afrique du Nord à la Sibérie. Il est ainsi présent sur l'ensemble de la France exceptée dans la région méditerranéenne où l'essence se raréfie. Au niveau de l'altitude, l'essence peut se trouver jusqu'à 1 200 m d'altitude : zone située entre l'étage collinéen et l'étage montagnard (correspondant également aux étages supra-méditerranéen et méditerranéen).

L'aulne glutineux est un arbre de taille moyenne (20 - 25 m) dont la longévité dépasse rarement 60-80 ans. Il rejette vigoureusement dans le jeune âge et se rencontre fréquemment en taillis. Il se situe surtout sur des matériaux de type argileux,

sableux, alluviaux, limono-argileux. De plus il est très tolérant vis-à-vis du niveau trophique.

Essence héliophile pionnière, l'aulne est une espèce qui a la capacité de coloniser rapidement les espaces ouverts (berges de rivières, plaines, pentes..) en particulier grâce à des akènes ailés qui sont disséminés par le vent.

Grâce à un enracinement profond, oblique et puissant capable de supporter des engorgements permanent, l'aulne glutineux est une espèce qui joue un rôle essentiel dans les écosystèmes rivulaires (ripisylves) en assurant le maintien des berges, la purification des eaux (Thoirain 2006), la structuration du sol et des niches à poissons. Par ailleurs, l'ombre apportée par les aulnes situés en bord de rivières permet de réduire le réchauffement des eaux et d'augmenter la biodiversité des cours d'eau.

Particularité de l'aulne glutineux, celui-ci vit en symbiose avec l'actinomycète *Frankia* grâce auquel il peut fixer l'azote de l'air et ainsi enrichir le sol et donc alimenter son environnement et lui même.

Les critères de reconnaissance (extrait de la Flore Forestière Française – N°1 Plaines et collines) sont les suivants :

- Tronc droit, houppier pyramidal à conique, aux branches arquées retombantes,
- Ecorce d'abord lisse, gris-vert, ponctuée de lenticelles, puis gris foncé se desquamant en écailles rectangulaires,
- Jeunes rameaux anguleux, brun verdâtre, ponctués de lenticelles, pourpres à l'automne,
- Feuilles alternes, arrondies, tronquées au sommet, en coin à la base, irrégulièrement dentées, glabres, vert foncé dessus, plus claires dessous,
- Fleurs mâles en longs chatons pendants,
- Fleurs femelles en courts chatons dressés, pourpres
- Petits cônes (strobiles) ligneux, noirs, longs de 10 à 30 mm
- Samares très petites, à aile circulaire.

## 2.2 Présentation de *Phytophthora alni*

### 2.2.1 Découverte et origine

*Phytophthora alni* a été mis en évidence pour la première fois durant l'été 1993 au Sud du Royaume-Uni, où il cause de nombreux dépérissements d'arbres (Gibbs, 1994 ; Brasier et al., 1995). C'est également la première fois qu'une espèce de *Phytophthora* affectant l'aulne a été signalée. La morphologie de cette espèce indiquait nettement qu'il s'agissait d'un nouvel agent pathogène jamais décrit auparavant.

Au début Brasier et al. (1995, 1999) ont proposé l'hypothèse que ce nouveau *Phytophthora* était issu de l'hybridation entre deux autres espèces avec lesquelles il est génétiquement proche : l'une connue, le *Phytophthora cambivora* ; l'autre non identifiée mais proche du *Phytophthora fragariae*. *Phytophthora cambivora* est une espèce polyphage touchant de nombreux arbres néanmoins il est peu pathogène sur l'aulne. *Phytophthora fragariae* touche plus les Rosacées et comme le *Phytophthora cambivora*, est peu pathogène sur l'aulne.

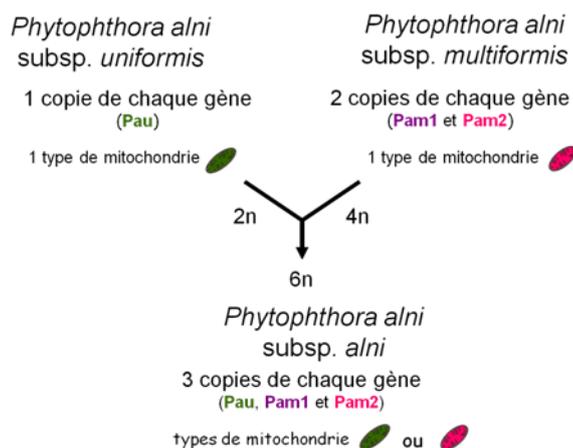
En 2004, 3 nouveaux taxons de *Phytophthora alni* ont été décrits :

- *Phytophthora alni* subsp. *alni* (Paa),
- *Phytophthora alni* subsp. *multiformis* (Pam),
- *Phytophthora alni* subsp. *uniformis* (Pau).

Ces 3 taxons sont pathogènes sur l'aulne mais le taxon Paa est le plus fréquent et est responsable du dépérissement des aulnes glutineux en Europe. Chaque taxon diffère de l'un à l'autre, d'un point de vue phénotypique, génotypique ou par leur distribution à l'échelle européenne. D'où la question concernant l'origine de tous les taxons de *Phytophthora alni*, question qui a été intensivement étudiée ces dernières années.

D'après ces études, *Phytophthora alni* subsp. *alni* est issu de l'hybridation entre *Phytophthora alni* subsp. *multiformis* et *Phytophthora alni* subsp. *uniformis* (cf. figure 1 ci-dessous). Ce résultat a été démontré à partir de la phylogénie de 4 gènes nucléaires et de l'ADN mitochondrial (Ioos et al. 2007). Ainsi l'hypothèse initiale de Brasier (1999) a été réfutée.

**Figure 1 : Schéma explicatif de l'hybridation de *Phytophthora alni***



Source : poster "Etude des conditions de l'émergence du *Phytophthora alni*" (J. AGUAYO et al. 2009)

*Phytophthora alni* frappe uniquement les espèces du genre *Alnus* (hybride interspécifique) et toutes les espèces d'aulnes européens sont sensibles à celui-ci. Il provoque chez ses hôtes un stress hydrique en infiltrant leur cambium pouvant ainsi entraîner à terme leur mort. Toutefois, *Alnus glutinosa* est l'espèce la plus sensible. Actuellement aucune résistance de la part de l'aulne n'a été mise en évidence.

*Phytophthora alni* est un bon exemple qui montre l'instabilité génétique et l'évolution actuelle dans le genre *Phytophthora*.

### 2.2.2 Importance et distribution du *Phytophthora*

Aujourd'hui, le parasite a été observé et décrit dans de nombreux pays européens dans lesquels il cause des dégâts considérables notamment en France, au Royaume-Uni, en Allemagne, et en Belgique. Il a également été mis en évidence en Autriche, au Danemark, en Finlande, en Hongrie, en Irlande, en Italie, en Lituanie, en Norvège, au Pays-Bas, en Pologne et en Suède.

Seul *Phytophthora alni* subsp. *uniformis* a été détecté hors d'Europe, en Alaska sur le sol d'un peuplement d'*Alnus incana*.

### 2.2.3 Symptômes de la maladie

Les symptômes observés sur les aulnes et qui peuvent indiquer la présence de *Phytophthora* sont les suivants (cf. photographies N°2, 3, 4 et 5 ci-dessous):

- Feuilles de taille réduite, vert terne ou vert jaune
- Perte foliaire entraînant une visualisation des branches dans le haut du houppier (cime plus claire et présence de branches mortes)

- Présence de suintements noirâtres (ou exsudats goudronneux), de taches de couleur noirâtre ou rouille et de nécroses corticales (nécroses fraîches de couleur brune plus ou moins intense, nécroses anciennes de couleur noires) de la base du tronc jusqu'à 2 mètres de hauteur voire même plus.

Les symptômes sur le tronc apparaissent en temps normal dans l'ordre suivant : apparition des taches rouilles en premier, puis apparition des suintements noirâtres et enfin apparition des nécroses corticales (stade final de l'évolution de ces symptômes).

- Fructification souvent plus abondante.

Ces critères pris séparément ne peuvent suffire à diagnostiquer la maladie due à *P. alni*, c'est l'ensemble des symptômes qui permet d'indiquer qu'il s'agit de l'expression de la maladie.



Photographie N°2 : nécroses corticales



Photographie N°3 : Taches de couleur rouille



Photographie N°4 : exsudats goudronneux



Photographie N°5 : Dépérissement – aulne sain à droite, aulne dépérissant à gauche

Source : Vallée du Thouet, 2005, Thomas SCORDIA.

Ces symptômes entraînent la destruction des tissus conducteurs (nécroses) provoquant une perturbation de la circulation de la sève. Le système racinaire est également touché. L'ensemble de ces symptômes peut entraîner la mort de la tige ou de la souche.

Remarque : les aulnes peuvent dépérir pour d'autres raisons que le *Phytophthora* : le houppier est alors clair comme pour une attaque de *Phytophthora* et souvent on observe la présence de branches mortes parmi les branches saines. Seulement dans le cas d'une attaque de *Phytophthora*, il n'y a pas de branches mortes qui côtoient des branches saines : le houppier est homogène et clair dans son ensemble.

## 2.2.4 Source d'inoculum et propagation de la maladie

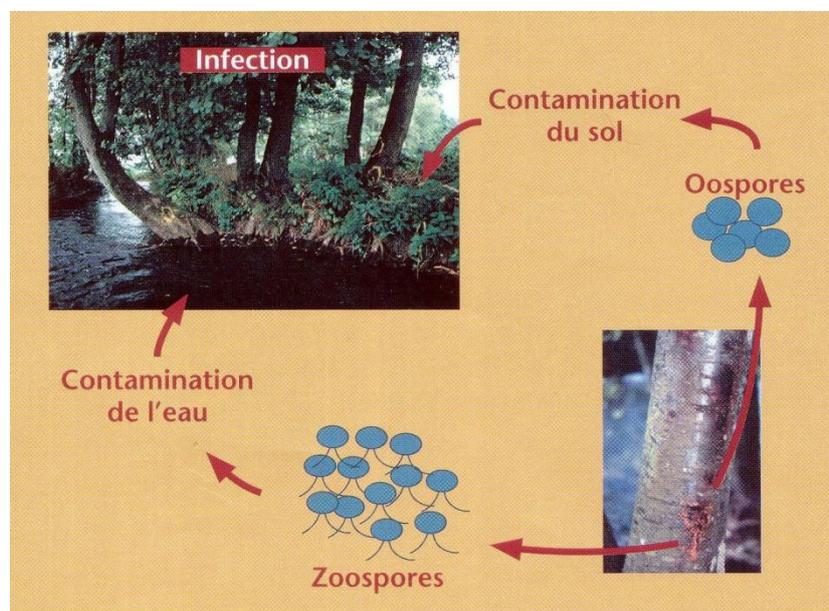
Il existe plusieurs sources d'inoculum du *Phytophthora alni*. L'une des premières sources est l'écorce nécrosée, en particulier au niveau des tissus récemment contaminés qui produiraient une quantité importante de sporanges infectieux (Lonsdale, 2003).

Comme de nombreuses autres espèces de *Phytophthora*, *P. alni* attaque les racines. Celles-ci produisent alors une quantité importante d'inoculum. La production d'inoculum dans l'eau de rivière n'a jamais été clairement quantifiée, par contre, elle a été mieux démontrée dans le sol. En effet la phase d'évolution du dépérissement de l'arbre détermine directement de la quantité d'inoculum produite dans le sol. La production par les aulnes est la plus forte en début d'infection (avant et juste après l'apparition des premiers symptômes de houppier). Lorsque l'arbre est très dépérissant ou mort, celui-ci n'est plus une source d'inoculum importante. La portée de l'arbre dans le sol au niveau de l'inoculum produit dans le sol par les racines est de 1,50 m. Ainsi les racines situées dans l'eau peuvent produire de l'inoculum dans la rivière et des arbres plus éloignés peuvent être infectés.

L'eau et le sol sont les vecteurs essentiels de la dissémination de la maladie, permettant le développement de la maladie (Lonsdale, 2003) (cf. figure 2). En effet, *P. alni* produit au cours de son cycle biologique deux types de spores :

- Les zoospores : spores aquatiques biflagellés, qui circulent dans l'eau et s'infiltrent chez l'aulne par l'intermédiaire de ses racines. Des blessures sur les aulnes provoquées par du gibier, du bétail, des débris divers de crues... seraient également des voies naturelles de pénétration de ces zoospores. Ces spores permettent ainsi la propagation du champignon le long des cours d'eau. (zoospores dans l'eau de rivière ; Streito et al., 2002 ; Jung and Blaschke, 2004 ; Husson et al., 2006 ; Aguayo, 2007).
- Les oospores (spores résistantes) contaminent le sol et sont capables de subsister plusieurs années dans la couche superficielle du sol si l'hôte est présent. Dans le cas contraire, les oospores ne survivent pas plus de 3 années. Ces spores seraient à l'origine de la contamination de zones encore indemnes par transport de matière végétal (terre, ...) par l'homme notamment mais aussi par les animaux (sabots).

Figure 2 : Cycle de dissémination du *Phytophthora alni*



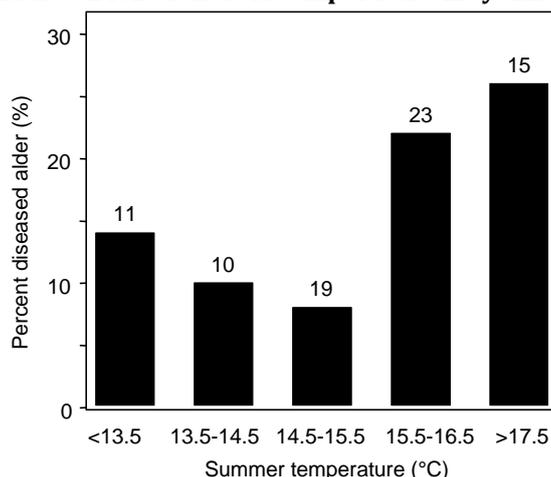
Source : Extrait de la Fiche d'information N°3 : La maladie de l'aulne, que faire ? – juin 2003 – Faculté universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux ; Centre de Recherches Agronomiques de Gembloux)

### 2.2.5 Facteurs de risques

Il a été présenté ci-dessus que le principal vecteur de l'agent pathogène était l'eau. Celle-ci joue ainsi un rôle primordial dans la dissémination de la maladie. En effet il a été montré que différents facteurs liés à l'eau avaient une influence sur le développement de la maladie.

Thoirain et al. (2007) ont mis en évidence que le type de cours d'eau était le facteur de risque le plus important : plus le courant est fort et la température de l'eau froide, moins les aulnes sont infectés contrairement au cours d'eau à courant lent et eau tempérée. La faible vitesse de ces courants favoriserait l'accumulation des zoospores au pied des aulnes et donc un risque plus important d'infection. (Husson et al. 2006). Par ailleurs, Thoirain et al. (2007) ont également mis en évidence que la température moyenne de l'eau en été avait une forte influence sur la prévalence de la maladie (cf. figure 3). En laboratoire, l'influence de la température a été étudiée et à déterminé que l'optimum de croissance se situait entre 22 – 25°C (Brasier et al. 1995 -2004).

**Figure 3 : Prévalence de la maladie en fonction de la température moyenne de l'eau en été (Thoirain et al., 2007).**

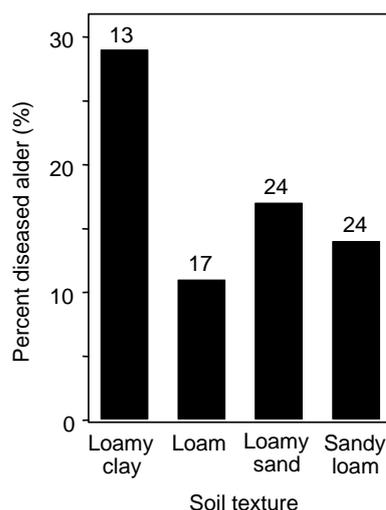


Par ailleurs la température de l'eau, ainsi que la qualité bactériologique, ont une influence sur la sporulation de *Phytophthora alni* (Chandelier et al. 2006).

La position de l'aulne au niveau de la berge joue un rôle très important. Plus l'aulne est proche de la rivière, plus la probabilité qu'il soit contaminé est importante (Gibbs et al. (1999))

La qualité du sol joue également un rôle important dans le développement de la maladie. En effet il a été montré que la prévalence de la maladie augmente avec le taux d'argile dans le sol (figure). De plus, le nombre d'arbres malades est plus élevé dans les sols limono-argileux. (Thoirain et al., 2007) (cf figure 4 ci-dessous)

**Figure 4 : Prévalence de la maladie en fonction du type de sol (Thoirain et al., 2007).**



Ces différents facteurs n'ont bien évidemment pas le même poids au niveau du développement de la maladie. Enfin, le facteur de risque le plus important reste l'introduction de *Phytophthora alni* dans des zones originellement saines (Ioos et al., 2006b)

### 3. Présentation du stage : épidémiologie de *Phytophthora alni*

#### 3.1 Avant-propos

Mon stage s'insère dans le cadre de 2 études : l'une, sur le terrain, menée sur le bassin de la Sèvre Niortaise, l'autre, en laboratoire, menée à l'INRA de Nancy.

##### 3.1.1 Etude des conditions de l'émergence de *Phytophthora alni*

Deux hypothèses ont été mises en évidence concernant l'émergence de *Phytophthora alni* :

- Soit la présence de *Phytophthora* serait due à une origine exotique, c'est-à-dire que l'introduction d'un ou des deux parents aurait entraîné l'hybridation et l'apparition de *Phytophthora alni*.
- Soit le changement climatique aurait entraîné une modification du milieu provoquant le déclenchement de l'épidémie.

Pour répondre à ces questions, il a été envisagé d'étudier d'une part, la structure des populations de l'agent pathogène, d'autre part le rôle de l'augmentation de la température de l'eau des rivières.

Afin d'étudier la structure des populations de *Phytophthora alni*, une prospection ainsi qu'une collecte d'isolats ont été réalisées sur le bassin Rhin-Meuse ainsi que sur d'autres bassins en France et à l'étranger (Europe, USA). C'est dans le cadre de cette collecte que l'étude sur le bassin de la Sèvre Niortaise entre en jeu, puisque les échantillons qui seront récoltés et identifiés compléteront la collection d'isolats de l'INRA.

Une étude génétique des populations permettra de déterminer, par la suite, le caractère exotique ou indigène de l'agent pathogène grâce à l'utilisation de marqueurs moléculaires de type microsatellites.

##### 3.1.2 Etat sanitaire des aulnes sur le Bassin de la Sèvre Niortaise et modalités de gestion des peuplements

En 2006, quelques tâches de couleur rouille et des exsudats goudronneux ont été repérés sur certains aulnes lors d'un diagnostic CREzh IIBSN. Un an plus tard, des aulnes morts sont observés sur la Sèvre Niortaise. En 2008, les symptômes de la maladie sont bien visibles (exsudats, aspect des houppiers...) et le taux de mortalité des aulnes est important sur le bassin.

Suite à ces dégâts, l'IIBSN, le PIMP, la DDEA et le CRPF se rencontrent en juillet 2008 afin d'identifier les symptômes et la présence du pathogène. En décembre 2008, une visite de terrain est réalisée avec ces organismes afin de repérer les symptômes de la maladie et de mettre en place une approche de gestion des peuplements. De cette visite découle le lancement d'une étude de la maladie et une gestion des aulnes sur la Sèvre Niortaise : étude de l'état sanitaire des aulnes sur le Bassin de la Sèvre Niortaise et modalités de gestion des peuplements. Cette étude se déroule sur deux zones :

- Les marais mouillés de la Sèvre niortaise, des Autizes et du Mignon (réseaux hydrauliques et parcelles)
  - L'amont du marais mouillés (rivières d'alimentation).
- (Cf. annexe 1)

et traite deux thèmes :

- L'état sanitaire des aulnes, la fréquence de la maladie et l'identification de l'agent pathogène,
- Les modalités de gestion des peuplements sains et infectés.

### 3.2 Objectifs

L'objectif de mon stage est de réaliser les isollements et l'identification de *Phytophthora* en laboratoire à partir des échantillons prélevés sur la Sèvre Niortaise. Ce travail permettra :

- De confirmer ou non la présence de *Phytophthora alni* sur le marais Poitevin,
- D'identifier les taxons présents (*P.alni* subsp *alni*, subsp *uniformis* ou subsp *multiformis*) afin de connaître leur niche écologique,
- De compléter la collection de *Phytophthora alni* de l'INRA afin de fournir du matériel pour étudier la structure génétique des populations de cet agent. L'objectif global de l'équipe est d'identifier les conditions de l'émergence du *Phytophthora alni*.

### 3.3 Méthodologie

#### 3.3.1 Prélèvement sur le terrain

Au niveau du terrain, un protocole a été rigoureusement appliqué afin que les échantillons d'aulnes qui sont envoyés à l'INRA se dessèchent le moins possible lors du transport permettant la meilleure conservation de l'échantillon. Ce protocole est décrit en annexe 2.

#### 3.3.2 Réception des échantillons

Les échantillons d'aulnes réceptionnés sont stockés provisoirement dans des boîtes contenant de l'eau osmosée afin d'éviter leur dessèchement avant leur analyse (cf. photographie N°6 ci-dessous).



**Photographie N°6 : Stockage des échantillons d'aulnes réceptionnés**

Remarque : l'eau des boîtes est changée deux fois par jour jusqu'à l'isolement afin de nettoyer au maximum les échantillons. En effet l'aulne contient énormément de tanins. Si les échantillons ne sont pas suffisamment rincés, les tanins se propagent dans les boîtes de Petri au moment de l'isolement ce qui engendre des lectures plus difficile de ces boîtes.

Au moment de la réception, les numéros des échantillons, attribués par le personnel du Poitou-Charentes, sont contrôlés pour vérifier s'ils correspondent bien avec la liste des échantillons envoyés en même temps que les échantillons. Une nouvelle codification, plus simple, que celle du

protocole du Poitou-Charentes est mise en place dans un but de simplification afin d'éviter d'éventuelles erreurs lors de la retranscription des numéros au moment des différentes étapes d'identification et de détection, c'est-à-dire que pour le premier échantillon qui a été reçu, celui-ci portait la codification suivante : MP1 bis / 8 / 1. Un nouveau numéro (numéro INRA) lui a été attribué, à savoir "1" et ainsi de suite pour les autres échantillons.

Dès lors que les résultats sont concluants au niveau des isolements, les échantillons d'aulnes sont autoclavés afin de stériliser les échantillons puis ceux-ci sont jetés.

### 3.3.3 Isolement sur un milieu spécifique

Sur chaque échantillon d'aulnes sont découpés de petits prélèvements d'environ 1cm de long et de quelques centimètres d'épaisseur au niveau de la zone active du *Phytophthora*. Ces prélèvements sont ensuite mis en culture sur du milieu MVA-c (milieu V8) (voir annexe 3). Ce milieu est fait à partir d'une base de jus de légumes clarifié. Il favorise la luxuriance et l'expression de l'aspect des colonies de champignons. Le nombre d'isolement par arbre est limité à 4 boîtes de Petri maximum contenant chacune 5 prélèvements de bois au maximum (cf. photographie N°7 ci-dessous).



**Photographie N°7 : Echantillon d'aulne isolé dans une boîte de Petri**

Puis, les boîtes de Petri sont placées dans une enceinte d'incubation à 20°C, sous obscurité, afin de permettre le développement du pathogène. En effet, *Phytophthora alni* est une espèce thermophile dont l'optimum de croissance se situe entre 22 et 25°C. La durée d'incubation est d'environ 4 jours pour les développements les plus rapides et de plus d'une semaine pour les plus lents.

### 3.3.4 Lecture des boîtes

Lorsque les mycéliums se sont suffisamment développés (cf. photographie N°8), les boîtes de Petri peuvent être lues. La reconnaissance du *Phytophthora alni* se fait suivant les caractères suivant :

- La culture : aspect de la colonie, aspect de la marge, sa croissance radiale.
- Les fructifications dans les cultures : oogones, oospores.
- Les sporanges.



**Photographie N°8 : Mycéliums développés sur échantillon d'aulne.**

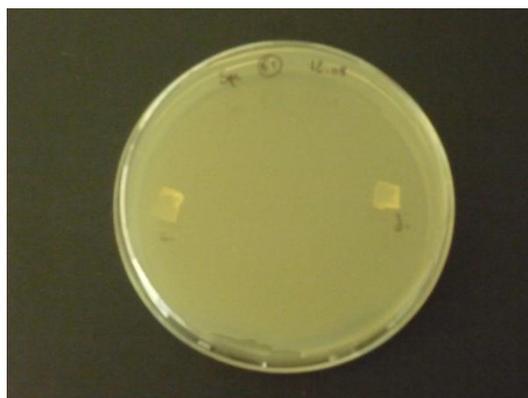
L'aspect de la colonie est jugé à l'œil nu. Ce jugement permet de déterminer si les colonies sont homogènes ou non. Ensuite la marge de la colonie est jugée sous microscope à faible grossissement (objectif x2,5) afin de voir si la marge est serrée ou non. En augmentant le grossissement, l'aspect des hyphes pourra être noté : parallèles, ramifiés, type de ramification, ondulés, contournés...

*Phytophthora alni* est caractérisé par :

- Une colonie homogène, apprimée, ne présentant pas de mycélium aérien ou très clairsemée. La croissance radiale de la colonie est d'environ 6 mm par jour.
- Une marge serrée,
- Une homothallie,
- La présence d'oogones amphigynes,
- des ovogonies présentant des tiges coniques variables avec des protubérances verruqueuses bullâtes (gamme de diamètre moyen 37 – 55 µm),
- des anthéridies qui sont principalement à deux loges et amphigynes présentant un septum basal difficile à observer. (plage de longueurs : 20 – 30 µm, plage de largeur : 15 – 20 µm),
- L'absence de chlamyospore,
- Des sporanges non papillés. (plage de largeur : 27,5 – 50 µm)

### 3.3.5 Repiquage

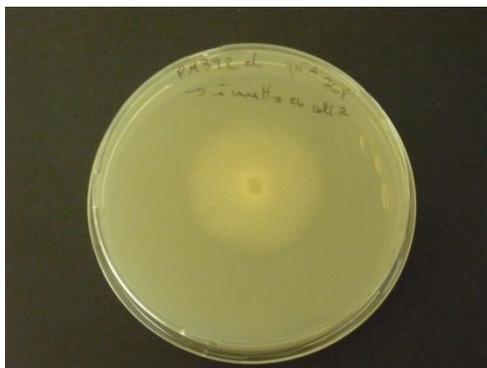
Les isolements positifs, c'est-à-dire les isolements où *Phytophthora* s'est développé, sont ensuite repiqués dans des boîtes de Petri contenant du milieu V8 spécifique (cf. annexe 3). 5 repiquages maximum sont réalisés par échantillon (cf. photographie N°9). Les boîtes sont ensuite placées dans une enceinte d'incubation à 20 – 22°C et à l'obscurité.



**Photographie N°9 : Repiquage dans une boîte de Petri**

### 3.3.6 Repiquage dans la collection

Une fois que les repiquages se sont suffisamment développés (cf. photographie N°10), ceux-ci sont conservés dans la collection de *Phytophthora alni* de l'INRA. Un nouveau numéro est attribué composé du taxon du *Phytophthora alni* auquel est ajouté un numéro, par exemple : PAA345 pour *Phytophthora alni* subsp *alni* et le numéro 345 correspond au 345<sup>ème</sup> *Phytophthora* rentré en collection.



**Photographie N°10 : Mycélium développé dans une boîte de Petri repiquée**

Deux modes de conservation sont réalisés pour l'entrée des isolats dans la collection :

- Repiquage dans des tubes Falcon de 14 ml,
- Repiquage dans des tubes Eppendorf de 2 ml.

### 3.3.6.1 Repiquage dans tube Falcon

Les isolats sont repiqués dans des tubes Falcon contenant du milieu V8 – RIF (cf. annexe 3). Pour chaque isolat, 2 tubes sont réalisés contenant un morceau de mycélium. Ce morceau est prélevé au niveau de la zone active du champignon afin de garantir la reprise du mycélium dans les tubes Falcon (cf. photographie N° 11). Les tubes sont ensuite stockés dans des boîtes dans un réfrigérateur.



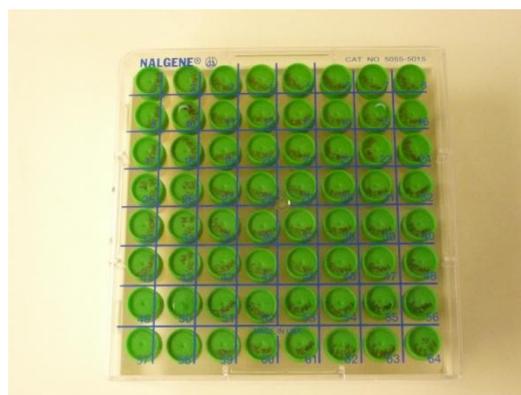
**Photographie N° 11 : Repiquage de mycélium dans des tubes Falcon**

### 3.3.6.2 Repiquage dans tube Eppendorf

Pour chaque isolat, 5 à 10 fragments de gélose sont prélevés à la marge de croissance du champignon et mis dans un tube Eppendorf contenant 1 ml d'eau ultra pure stérile. Les tubes sont ensuite stockés dans des boîtes dans une salle climatisée et sous obscurité (cf. photographies N°12 et 13 ci-dessous).



**Photographie N° 12 : Tube Eppendorf**



**Photographie N°13 : Boîte de stockage des Tubes Eppendorf**

### 3.3.7 Identification du taxon des *Phytophthoras* isolés

Afin de déterminer exactement le taxon de *Phytophthora alni* (subsp. *alni*, *uniformis* ou *multiformis*), des PCR espèce spécifique (Polymerase Chain Reaction) sont réalisées.

#### 3.3.7.1 Extraction de l'ADN des isolats

Pour chaque isolat, du mycélium est prélevé puis placé individuellement dans des tubes disposés dans des plaques à 96 échantillons pour extraction de l'ADN. 5 prélèvements maximum de mycélium sont prélevés par isolat. Des témoins sont également placés au niveau de la plaque :

- du mycélium de *P. alni* subsp. *alni* est utilisé comme témoin positif
- une zone vide est utilisée comme témoin négatif d'extraction.

Une fois la plaque remplie, l'ADN peut être extrait à l'aide du kit Dneasy®96 Plant Qiagen et suivant le protocole situé en annexe 4. L'ADN extrait est ensuite stocké au congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.3.7.2 Réalisation de la PCR

La détection du taxon de *Phytophthora alni* sur les extraits d'ADN est réalisée par PCR en temps réel grâce au thermocycleur Chromo 4 TM Real-Time PCR Detector et au logiciel Opticon Monitor (cf. tableau 1).

**Tableau 1 : Paramètres du programme PCRq.**

phase	température	durée	
Activation Uracil-N-Glycolase	50	2 min	
Activation Taq polymérase	95	10 min	
Dénaturation	95	15 sec	} 40 cycles
Hybridation-élongation)	60	1 min	

Afin de lancer la PCR, 2 couples d'amorces, T-Pau F/R et T-Pam F/R sont utilisés en duplex avec leur sonde TaqMan, T-Pau-P et T-Pam-P respectivement (cf. tableau 2). La composition du mélange réactionnel est indiquée dans le tableau 3.

**Tableau 2 : Types, séquences et spécificité des couples d'amorces et des sondes Taqman utilisés.**

Amorce/sonde	séquence (5'-3')	Spécificité
<b>T-Pau-F (amorce)</b>	CGG-CCG-TTG-ACA-TGT-TTA	<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i> et
<b>T-Pau-R (amorce)</b>	GGG-CGC-CAT-ACA-AAA-TC	<i>P. alni</i> subsp. <i>uniformis</i>
<b>T-Pau-P (sonde)</b>	TCG-GGT-TTT-GTT-TGG-TGC-TGT	
<b>T-Pam-F (amorce)</b>	AAT-CGG-AGT-GCG-AAC-CTT-AG	<i>P. alni</i> subsp. <i>alni</i> et
<b>T-Pam-R (amorce)</b>	CGT-CGA-CTT-TGT-GAG-TGC-TG	<i>P. alni</i> subsp. <i>multiformis</i>
<b>T-Pam-P (sonde)</b>	TGT-TGG-ACC-CGG-GAC-GGT-CT	

Tableau 3 : composition du mélange réactionnel

Composant	Concentration finale	1 volume [ $\mu$ l]
Eau Ultra Pure	-	11,7
Tampon polymérase	1x	2
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	2
Amorce Pau-F	0.3 $\mu$ M	0,2
Amorce Pau-R	0.3 $\mu$ M	0,2
Amorce Pam-F	0.3 $\mu$ M	0,2
Amorce Pam-R	0.3 $\mu$ M	0,2
Sonde Pau	0.1 $\mu$ M	0,2
Sonde Pam	0.1 $\mu$ M	0,2
UNG	0.01 U	0,2
DNTPs mix	0.2 mM	0,8
Taq Polymérase	0.5U	0,1
ADN extraite	-	2
<b>Volume total</b>	<b>-</b>	<b>20</b>

### 3.4 Résultats et critiques

Durant l'été, 100 échantillons provenant du marais de Poitevin ont été envoyés à l'INRA. Sur les 100, *Phytophthora alni* a été isolé sur 70 arbres. Pour ce genre de pathogène, un taux de 70% est excellent ce qui signifie que les échantillons ont été bien choisis, bien prélevés et que l'isolement a été bien réalisé. La répartition des isollements se fait de la manière suivante :

- 63 *P. alni subsp. alni* (PAA), l'hybride le plus fréquent et celui qui provoque l'épidémie :
  - 61 ont été trouvés dans la zone aval,
  - 1 à la limite des 2 zones,
  - et 1 en amont.
- 7 *P. alni subsp. multiformis* (PAM), un des parents de l'hybride : tous situés dans la zone amont
- 25 isollements négatifs
- 1 *Phytophthora* sp. (différent de *P. alni*)

Aucun *P. alni subsp. uniformis* (PAU) n'a été isolé.

Ainsi, les 2 zones qui ont été définies à l'avance dans l'étude sur le bassin de la Sèvre niortaise, amont et aval, se différencient très nettement au niveau des populations de *P. alni*. En amont, nous avons isolé une très grande majorité de PAM, une des espèces parentales. En aval, seul PAA, l'hybride, a été détecté. Le fait que PAM soit identifié uniquement en amont, c'est-à-dire dans des milieux moins anthropisés que l'aval, milite pour une origine plutôt indigène de ce taxon, ou, en tout cas, pour une introduction dans le bassin de la Sèvre Niortaise plus ancienne de PAM que de PAA. Ces résultats confirment la parenté entre PAM et PAA.

La plupart des échecs d'isolement proviennent d'arbres localisés en amont. En effet, nous avons obtenues 90% d'isollements positifs sur les arbres prélevés en aval et 30% en amont. Les échecs d'isolement peuvent être dus à des nécroses causées par des blessures ou piqûres d'insectes.

Toutefois, au vu de la répartition des taxons amont-aval, le plus probable est que ces échecs sont dus à des isolats moins viables et donc plus difficilement isolables au laboratoire. Il est connu que PAM est moins agressif que PAA et beaucoup plus rare en milieu naturel (tout comme PAU). Sa survie, et par conséquent son isolement, est sans doute beaucoup plus faible.

Concernant l'étude des conditions de l'émergence du pathogène, ces isolats constitueront une population précieuse pour l'étude de la structure génétique des populations avec d'autres outils moléculaires.

L'objectif de mon stage était d'isoler et d'identifier le *Phytophthora alni* dans les échantillons d'aulne envoyés du Poitou-Charentes. La grande inquiétude que j'avais concernant ce travail était mon inexpérience en laboratoire ce qui pouvait engendrer de nombreuses erreurs de manipulation et ainsi fausser les résultats. Compte-tenu des résultats obtenus (70% d'échantillons isolés), mon inexpérience n'a pas eu de conséquences néfastes.

#### 4. Acquis personnels

Ce stage a été une expérience très enrichissante pour moi. Il m'a permis de découvrir *Phytophthora alni* sous un autre angle à savoir celui de la recherche et de compléter ainsi les connaissances que j'avais concernant ce pathogène. De plus, en effectuant mon stage à l'INRA, j'ai pu découvrir le monde de la recherche scientifique qui était un domaine que je ne connaissais pas et donc acquérir des techniques de travail ainsi que des connaissances de laboratoire (manipulations, protocoles...).

Par ailleurs, étant dans une unité qui travaille sur plusieurs maladies, j'ai eu l'occasion de discuter ou de travailler sur d'autres maladies que celle du *Phytophthora* telles que la rouille du peuplier ou *Chalara fraxinea* (maladie touchant le frêne) me permettant ainsi d'enrichir mes connaissances en matière de pathologie forestière.

Enfin d'un point de vue humain, ce stage à l'INRA a été pour moi l'occasion de discuter avec des chercheurs, des ingénieurs d'études, des doctorants et d'autres stagiaires sur divers thèmes scientifiques (techniques de manipulation de laboratoire, recherche scientifique vs recherche appliquée...).

Pour finir, ce stage m'a permis de me rendre compte que je n'aspirais pas spécialement à la recherche scientifique pure et dure mais plus à la recherche appliquée voire finalisée. Il m'a permis également de me rendre compte que la pathologie forestière était un domaine qui m'intéressait fortement et que j'orienterais sûrement mon stage de fin d'études voire mon activité professionnelle vers ce domaine.

## Conclusion

L'isolement et l'identification de *Phytophthora alni* a permis de mettre en évidence sa présence sur 70 échantillons d'aulnes sur 100 envoyés. Un tel résultat est un taux excellent pour ce type de pathogène.

Par ailleurs plusieurs types de taxons de *Phytophthora* ont été identifiés : à savoir *Phytophthora alni* subsp *alni* (PAA), le plus fréquent et *Phytophthora alni* subsp *multiformis*, l'un des parents de PAA. La niche écologique de ces taxons a ainsi pu être précisée. PAM est présent uniquement en amont et PAA en aval. Ces résultats confirment un caractère indigène ou une introduction plus ancienne de PAM que de PAA.

Cet ensemble d'isolats constitue une population précieuse pour l'étude de la structure génétique des populations du *Phytophthora* menée par l'INRA afin d'étudier l'émergence du *Phytophthora alni*.

Par ailleurs les isolements ont permis de confirmer la présence de *Phytophthora alni* sur le bassin de la Sèvre Niortaise. Ainsi les acteurs de IIBSN pourront proposer des modalités de gestion des peuplements d'aulnes compte-tenu des résultats obtenus à l'INRA.

Enfin, pour conclure, ce stage a été pour moi une expérience très enrichissante tant du point de vue des connaissances scientifiques sur le *Phytophthora* et la pathologie forestière en générale, que d'un point de vue humain ainsi que d'un point de vue professionnalisant.

## Bibliographie

### Ouvrages :

- **BRASIER C. M., KIRK S. A., DELCAN J., COOKE D.E.L., JUNG T., MAN IN'T VELD W.A.**, *Phytophthora alni* sp. Nov. and its variants : designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on alnus trees, *Mycology Research*, October 2004, N°108, p. 1172 – 1184.
- **BRASIER C.M., ROSE J. and GIBBS J. N.**, An unusual *Phytophthora* associated with widespread alder mortality in Britain, *Plant Pathology*, N°44, 1995, p 999 – 1007
- **DE CHATELPERRON A., BROSSE P., VALLEE B.**, Dossier Valorisation des essences dites « secondaires » (Fiches essences : Aulne glutineux), *Forêt entreprise*, n° 138, 2001, p. 33-34
- **DELATOUR C.**, Atlas illustré de quelques *Phytophthoras* (aide à leur identification morphologique), Document Unité de Pathologie forestière, INRA de Nancy, 31 août 2002, 168 p.
- **Faculté universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux**, Centre de Recherches Agronomiques de Gembloux, *Fiche d'information N°1 : La nouvelle maladie de l'aulne causée par Phytophthora « alni » - mai 2001*, Jambes (Belgique), F. Lambot, 2001
- **Faculté universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux**, Centre de Recherches Agronomiques de Gembloux, *Fiche d'information N°3 : La maladie de l'aulne, Que faire ?*, juin 2003 – Jambes (Belgique), F. Lambot, 2003
- **IOOS R., ANDRIEUX A., MARÇAIS B., FREY P.**, Genetic characterization of the natural hybrid species *Phytophthora alni* as inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses, *Fungal Genetics and Biology*, N°43, 2006, p. 511 – 529
- **RAMEAU J.C., MANSION D., DUME G.**, *Flore Forestière Française, guide écologique illustré, Tome 1 Plaines et Collines*, Institut pour le Développement Forestier, 1994 – 1784 p.
- **STREITO J.C.**, *Dépérissement de l'Aulne glutineux dans le bassin Rhin-Meuse, Rapport d'étude sur le Phytophthora de l'aulne 1999-2001* – Agence de l'Eau Rhin-Meuse, FDGDEC 54 – Septembre 2002 – 76 p.
- **STREITO J.C.**, *Dépérissement de l'Aulne glutineux dans le bassin Rhin-Meuse, Synthèse des connaissances et conseils de gestion*, Agence de l'Eau Rhin-Meuse, FDGDEC 54, Septembre 2002 – 14 p.
- **THOIRAIN B., HUSSON C. and MARÇAIS B.**, Risk factors for the *Phytophthora* – Induced Decline of Alder in Northeastern France, *Ecology and Epidemiology*, Vol. 97, N°1, 2007, p.99 – 105.

### Mémoires :

- **JANOUSEK Josef**, Facteurs environnementaux favorisant le dépérissement de l'aulne dû à *Phytophthora alni*, Université Henri Poincaré, 2008-2009, 24 p.

### Sites internet :

- **INRA**, L'institut national de la recherche agronomique [en ligne], 2009 [consulté le 30 octobre 2009], Disponible sur [www.inra.fr](http://www.inra.fr)
- **UMR 1136 – Equipe de Pathologie Forestière**, [en ligne], 2007 [consulté le 30 octobre 2009], disponible sur <http://mycor.nancy.inra.fr/fr/team/patho/index.php>

## Liste des abréviations

BioSE : école doctorale Biologie – Santé – Environnement  
CREzh : Contrats de Restauration et d'Entretien des Zones Humides  
CRPF : Centre Régional de la Propriété Forestière  
DDEA : Direction Départementale de l'Équipement et de l'Agriculture  
ENGREF : Ecole Nationale du Génie Rural des Eaux et Forêts  
FABELOR : Forêt – Agroalimentaire – Biotechnologies – Environnement - LORraine  
IIBSN : Institut Interdépartemental du Bassin de la Sèvre Niortaise  
INPL : Institut National Polytechnique de Lorraine  
INRA : Institut National de Recherche Agronomique  
MVA : Multivitamin Agar  
NFZ.forestnet : Nancy – Freiburg – Zürich. forestnet  
ONF : Office National des Forêts  
P. alni : *Phytophthora alni*  
PAA : *Phytophthora alni* subsp *alni*  
PAM : *Phytophthora alni* subsp *multiformis*  
PAU : *Phytophthora alni* subsp *uniformis*  
PIMP : Poitou Interrégional du Marais Poitevin  
RP2E : Ecole doctorale Ressources Procédés Produits Environnement  
SJPEG : Ecole doctorale Sciences Juridiques, Politiques, Economiques et de Gestion  
Subsp : subspecies  
UHP : Université Henri Poincaré

# Table des matières

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>1. PRESENTATION DE L'ORGANISME D'ACCUEIL : L'INRA</b> .....	<b>2</b>
1.1 L'INRA EN FRANCE.....	2
1.2 L'INRA EN LORRAINE .....	2
1.2.1 <i>Les structures et les hommes</i> .....	3
1.2.2 <i>Partenariat</i> .....	4
1.3 EQUIPE D'ÉCOLOGIE DES CHAMPIGNONS PATHOGENES FORESTIERS.....	4
1.4 POURQUOI L'INRA ? .....	5
<b>2. PRESENTATION DU CONTEXTE</b> .....	<b>5</b>
2.1 PRESENTATION DE L'AULNE GLUTINEUX.....	5
2.2 PRESENTATION DE <i>PHYTOPHTHORA ALNI</i> .....	6
2.2.1 <i>Découverte et origine</i> .....	6
2.2.2 <i>Importance et distribution du Phytophthora</i> .....	7
2.2.3 <i>Symptômes de la maladie</i> .....	7
2.2.4 <i>Source d'inoculum et propagation de la maladie</i> .....	9
2.2.5 <i>Facteurs de risques</i> .....	10
<b>3. PRESENTATION DU STAGE : EPIDEMIOLOGIE DE <i>PHYTOPHTHORA ALNI</i></b> .....	<b>11</b>
3.1 AVANT-PROPOS .....	11
3.1.1 <i>Etude des conditions de l'émergence de Phytophthora alni</i> .....	11
3.1.2 <i>Etat sanitaire des aulnes sur le Bassin de la Sèvre Niortaise et modalités de gestion des peuplements</i> .....	11
3.2 OBJECTIFS.....	12
3.3 METHODOLOGIE .....	12
3.3.1 <i>Prélèvement sur le terrain</i> .....	12
3.3.2 <i>Réception des échantillons</i> .....	12
3.3.3 <i>Isolement sur un milieu spécifique</i> .....	13
3.3.4 <i>Lecture des boîtes</i> .....	13
3.3.5 <i>Repiquage</i> .....	14
3.3.6 <i>Repiquage dans la collection</i> .....	14
3.3.6.1 <i>Repiquage dans tube Falcon</i> .....	15
3.3.6.2 <i>Repiquage dans tube Eppendorf</i> .....	15
3.3.7 <i>Identification du taxon des Phytophthoras isolés</i> .....	16
3.3.7.1 <i>Extraction de l'ADN des isolats</i> .....	16
3.3.7.2 <i>Réalisation de la PCR</i> .....	16
3.4 RESULTATS ET CRITIQUES.....	17
<b>4. ACQUIS PERSONNELS</b> .....	<b>18</b>
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>19</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>20</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>21</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>22</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b> .....	<b>23</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX</b> .....	<b>23</b>
<b>TABLE DES PHOTOGRAPHIES</b> .....	<b>23</b>
<b>LISTE DES ANNEXES</b> .....	<b>24</b>

## Table des figures

FIGURE 1 : SCHEMA EXPLICATIF DE L'HYBRIDATION DE <i>PHYTOPHTHORA ALNI</i> .....	7
FIGURE 2 : CYCLE DE DISSEMINATION DU <i>PHYTOPHTHORA ALNI</i> .....	9
FIGURE 3 : PREVALENCE DE LA MALADIE EN FONCTION DE LA TEMPERATURE MOYENNE DE L'EAU EN ETE (THOIRAIN <i>ET AL.</i> , 2007). ....	10
FIGURE 4 : PREVALENCE DE LA MALADIE EN FONCTION DU TYPE DE SOL (THOIRAIN <i>ET AL.</i> , 2007). ....	10

## Table des tableaux

TABLEAU 1 : PARAMETRES DU PROGRAMME PCRQ.....	16
TABLEAU 2 : TYPES, SEQUENCES ET SPECIFICITE DES COUPLES D'AMORCES ET DES SONDAS TAQMAN UTILISES. ....	16
TABLEAU 3 : COMPOSITION DU MELANGE REACTIONNEL .....	17

## Table des photographies

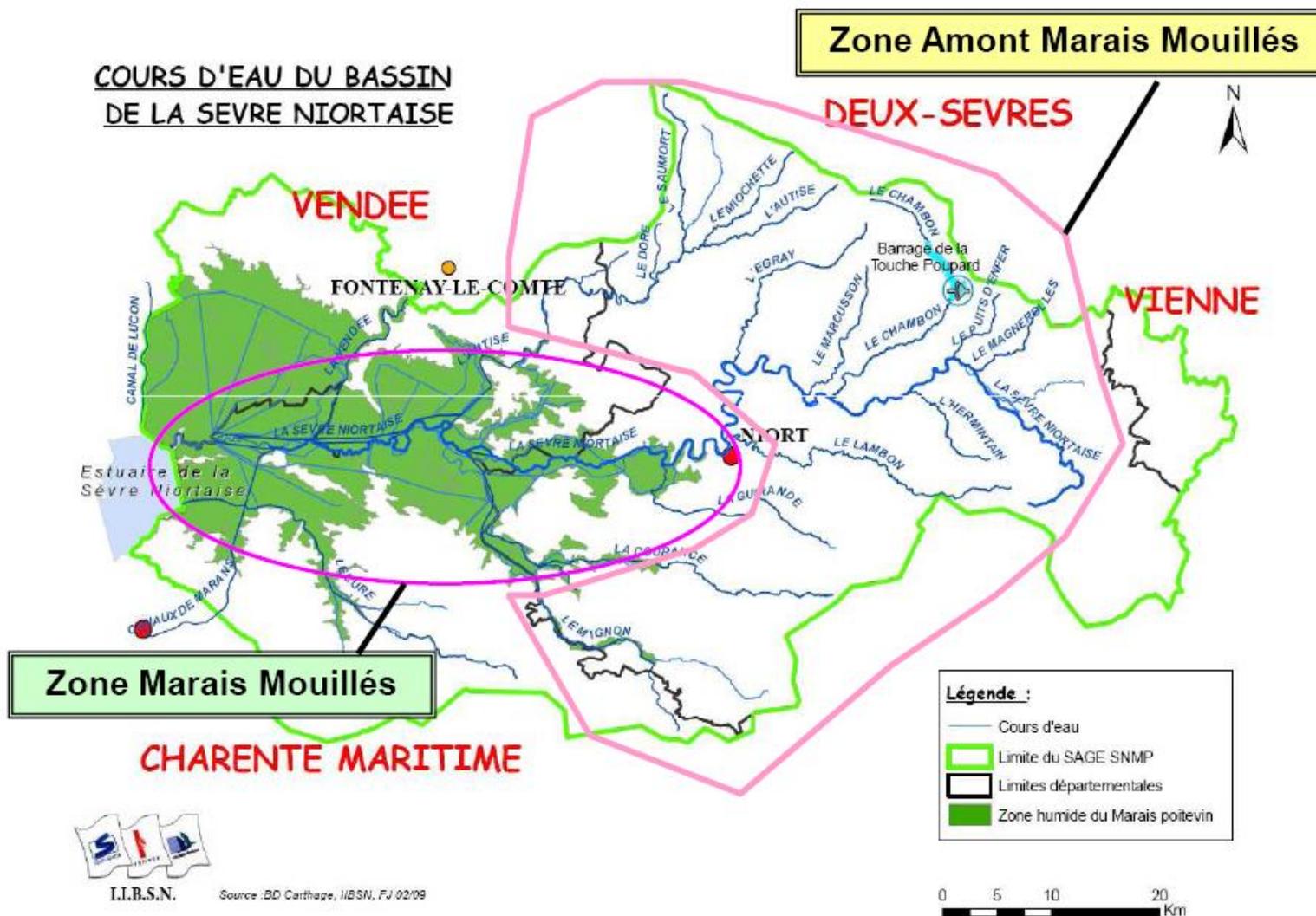
PHOTOGRAPHIE N°1 : AULNE GLUTINEUX, VALLEE DU THOUET, 2005, THOMAS SCORDIA .....	5
PHOTOGRAPHIE N°2 : NECROSES CORTICALES .....	8
PHOTOGRAPHIE N°3 : TACHES DE COULEUR ROUILLE .....	8
PHOTOGRAPHIE N°4 : EXUDATS GOUDRONNEUX.....	8
PHOTOGRAPHIE N°5 : DEPERISSEMENT – AULNE SAIN A DROITE, AULNE DEPERISSANT A GAUCHE CORTICALES.....	8
PHOTOGRAPHIE N°6 : STOCKAGE DES ECHANTILLONS D'AULNES RECEPTIONNES.....	12
PHOTOGRAPHIE N°7 : ECHANTILLON D'AULNE ISOLE DANS UNE BOITE DE PETRI.....	13
PHOTOGRAPHIE N°8 : MYCELIUMS DEVELOPPES SUR ECHANTILLON D'AULNE. ....	13
PHOTOGRAPHIE N°9 : REPIQUAGE DANS UNE BOITE DE PETRI.....	14
PHOTOGRAPHIE N°10 : MYCELIUM DEVELOPPE DANS UNE BOITE DE PETRI REPIQUEE.....	15
PHOTOGRAPHIE N°11 : REPIQUAGE DE MYCELIUM DANS DES TUBES FALCON .....	15
PHOTOGRAPHIE N°12 : TUBE EPPENDORF .....	15
PHOTOGRAPHIE N°13 : BOITE DE STOCKAGE DES TUBES EPPENDORF .....	15

## Liste des annexes

ANNEXE 1 : LOCALISATION DE LA ZONE D'ETUDE SUR LE BASSIN DE LA SEVRE NIORTAISE .....	I
ANNEXE 2 : PROTOCOLE D'IDENTIFICATION DU CHAMPIGNON.....	II
ANNEXE 3 : PROTOCOLE DE PREPARATION DU MILIEU MVA-C.....	III
ANNEXE 4 : PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ADN.....	IV

Annexe 1 : Localisation de la zone d'étude sur le bassin de la Sèvre Niortaise

# Territoire d'étude



I.I.B.S.N. Source :BD Carthage, IIBSN, FJ 02/09

## Annexe 2 : Protocole d'identification du champignon

Des prélèvements seront effectués sur les deux zones d'étude afin de d'identifier le ou les phytophthoras présents sur le cours d'eau. Le protocole de prélèvement tiré du Rapport d'étude sur le *Phytophthora* de l'aulne 1999-2001 : "Dépérissement de l'aulne glutineux dans le Bassin Rhin-Meuse" sera utilisé. Les recommandations pour un prélèvement en vue d'une analyse *Phytophthora* sont les suivantes :

- **Symptômes du champignon :**

Les feuilles sont plus rares, plus petites et jaunâtres, mais il n'y a pas de descente de cime ; le houppier est homogène. A la base du tronc, présence de tâches de couleur rouille, brune ou noire associées ou non à des exsudats goudronneux noirs.

- **Prélèvement de champignon :**

Prélever un morceau d'écorce et de bois attenant, au niveau du tronc. Le champignon est beaucoup plus difficile à prélever et à isoler sur les racines et les vieux arbres, il est donc préférable de prélever sur des jeunes individus.

Sonder l'écorce à l'aide d'un couteau afin de mettre en évidence les nécroses des tissus sous-corticaux. Trouver la limite de la nécrose, vérifier qu'elle est humide, que les tissus sont turgescents, que la partie nécrosée est bien adhérente à la partie saine. Si c'est le cas, prélever au ciseau à bois un morceau d'écorce de 10 cm de côté en limite de nécrose (si possible à côté de la zone endommagée par le sondage). Essayer de prélever une épaisseur de bois d'un centimètre adhérente à l'écorce (cependant les deux parties se détachent souvent lors du prélèvement).

La date du prélèvement importe peu : il est possible d'isoler le *Phytophthora* de l'aulne tout au long de l'année. L'essentiel est d'observer des symptômes typiques et des nécroses actives. La fin de l'été et le début de l'automne semblent être des périodes propices à l'extériorisation des symptômes.

Le prélèvement peut s'effectuer au delà des 200 m de la placette, on peut prélever jusqu'à 200 m en amont et en aval de celle-ci.

- **Méthode de conservation :**

Le *Phytophthora* de l'aulne est assez résistant. Les échantillons peuvent être conservés 48 à 72 h au réfrigérateur (voir plus). Il faut cependant éviter leur déshydratation. Les échantillons de grande taille y sont moins sensibles. Pour les maintenir au frais, il est possible de les envelopper dans du papier journal humidifié par l'eau de la rivière (attention il faut utiliser l'eau de la rivière à côté de l'arbre prélevé), puis dans un sac plastique. Ils doivent être envoyés dès que possible au laboratoire.

Si l'échantillon ne peut être acheminé rapidement (fin de semaine par exemple), il est préférable de retarder l'envoi : dans ce cas, il est possible de le conserver quelques jours en bas du réfrigérateur (même précaution que précédemment).

- **Nombre d'échantillon en zone des marais mouillés**

Effectuer 2 échantillons par placette.

- **Nombre d'échantillon en zone amont du marais**

Effectuer 5 échantillons pour chaque placette.

- **Précaution sanitaire**

Après chaque échantillonnage on désinfectera à l'alcool à 70° les outils de prélèvements.

Nettoyer les bottes entre la zone du marais mouillé et la zone amont du marais. Dans la zone amont le nettoyage sera systématique d'une rivière à une autre.

## Annexe 3 : Protocole de préparation du milieu MVA-C

### MVA-c (Clarified Multivitamin Agar = Milieu Multivitaminé Clarifié = V8

Milieu pour croissance et aspect cultural

Joker*	354 ml	333 ml	1l
CaCO <sub>3</sub>	5 g	4,7 g	14,1 g

\* Joker = cocktail de jus de légumes

Mélanger quelques minutes à l'agitateur magnétique

Centrifuger à 4000 t/mn pendant 10 mn

Récupérer le surnageant puis centrifuger à nouveau 10 min => Joker clarifié

Joker clarifié	200 ml	100 ml	300ml
Agar	20 g	10 g	30 g
H <sub>2</sub> O	800 ml	400 ml	1200 ml
	pour 1 L	pour 0,5 L	pour 1,5 L

**Autoclaver** 120°C, 20 mn

Pour le milieu **V8 spécifique**, ajouter quand le milieu est encore tiède (env. 45-50°C) :

Pimaricine (10 mg)*	400 µl
Ampicilline anhydre	200 mg
Rifampicine (10 mg)**	1 ml
Hymexasol (50 mg m.a) (ss forme Tachigaren)	67 mg
Benomyl***	15 mg

\* Pimaricine : suspension aqueuse à 2,5% (0,5 g/20 ml)

\*\*Rifampicine : solution à 10 mg/ml dans méthanol

\*\*\*Benomyl : dissoudre 15 mg / 3 ml acétone

Couler les boites de Petri et les laisser **bien sécher** sous la hotte.

Stocker impérativement à l'**obscurité** au **frigo**.

Pour le milieu **V8 rifampicine** ajouter quand le milieu est encore tiède (env. 45-50°C) :

Rifampicine (10 mg)	1,6 ml
---------------------	--------

\*\*Rifampicine : solution à 10 mg/ml dans méthanol

## Annexe 4 : Protocole d'extraction d'ADN

 <b>INRA</b> INRA Nancy Equipe Pathologie Forestière UMR IAM 1136 54 280 CHAMPENOUX	<b>Extraction d'ADN en plaque de 96 puits (kit DNeasy® 96 plant)</b>	Réf : MO-EXT-07 Version 1 date : 01.02.2007 page 1/3
---	--	---

### 1. Objet et domaine d'application

Extraction d'ADN en plaques soit 96 échantillons à l'aide du kit d'extraction QIAGEN "DNeasy® 96 Plant" référence : 69181

### 2. Documents de référence

Notice du kit DNeasy® 96 plant QIAGEN.

### 3. Hygiène et sécurité

**Attention :** Ne pas ajouter d'eau de javel ou de solution acide directement aux déchets de kit d'extraction, ces déchets contiennent de l'hypochlorite de guanidine provenant du tampon AP3/E, il peut se former un composant hautement réactif.

#### Mettre une blouse et des gants pour manipuler ces tampons ;

Tampon AP3/E du kit : nocif si ingéré et irritant pour les yeux.

Tampon AP2 du kit : contient de l'acide acétique : irritant pour les yeux et la peau.

RNase A : Peut provoquer des allergies par inhalation et contact avec la peau.

### 4. Matériels nécessaires

- Billes de tungstène de diamètre 3mm Qiagen référence : 699997
- Micropipette multicanale électronique BIOHIT.
- Réservoir à solution pour l'utilisation de la micropipette multicanale .
- Centrifugeuse 4K15C avec rotor pour plaque .
- Bain marie à 65°C.
- Broyeur TissueLyser Qiagen.

### 5. Contenu du mode opératoire

1- Préchauffer le tampon AP1 à 65°C ; et éventuellement le tampon AE

Toutes les étapes de centrifugation se font à température ambiante. Mais avec la centrifugeuse 4K15C, il faut régler la température à 40°C pour toutes celles ci.

#### BROYAGE :

Le broyage des échantillons en présence de tampon de lyse permet d'obtenir de l'ADN "idéal" pour la PCR tandis que le broyage d'échantillon dans l'azote liquide permet d'obtenir un bon rendement d'ADN de haut poids moléculaires.

Il n'est pas recommandé de broyer du matériel congelé dans du tampon de lyse car on peut obtenir un moins bon rendement d'extraction et de l'ADN dégradé.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Axelle ANDRIEUX		
Fonction :	TR		
Visa :			

 INRA Nancy Equipe Pathologie Forestière UMR IAM 1136 54 280 CHAMPENOUX	<b>Extraction d'ADN en plaque de 96 puits (kit DNeasy® 96 plant)</b>	Réf: MO-EXT-07 Version 1 date : 01.02.2007 page 2/3
--	--	--

2- Placer les feuilles fraîches dans les "collection microtubes", microtubes sur rack fournis avec le kit (jusqu'à 50mg d'échantillon frais ou 10mg d'échantillon sec).

3- Ajouter une bille de tungstène dans chaque échantillon.

4- Mélanger du tampon AP1, de la RNase A et du réactif DX suivant les proportions ci dessous:

AP1	:	400µl
RNase 1	:	1µl
Réactif DX	:	1µl

Cette solution de lyse doit être préparée extemporanément, ne préparer que la quantité nécessaire.

Placer cette solution dans un réservoir (max=100ml) afin de pouvoir utiliser la pipette multicanale.

5- Ajouter **400 µl de cette solution de lyse** au matériel à broyer. Fermer les microtubes avec les bouchons "caps for Round Well Blocks and collection Microtubes".

Note : Si on utilise du matériel sec, incuber le broyat dans la solution de lyse à 65°C pendant 10-20min.

6- **Broyer** les échantillons à l'aide du broyeur Retsch ; **agiter 1.5 min à 30Hz** (paramètre à définir suivant l'échantillon à broyer). Utiliser les adaptateurs pour plaque du kit "DNeasy 96 Plant" (enlever le couvercle du rack).

Retourner le sandwich et agiter de nouveau 1.5min à 30Hz.

7- Faire un **pulse** des tubes (3000rpm) pour pooler la totalité de l'échantillon et éliminer la mousse. Ne pas prolonger cette étape.

8- Enlever et jeter les bouchons et ajouter **130µl de tampon AP2** à chaque échantillon.

9- Fermer les tubes avec de nouveaux bouchons, s'assurer que les bouchons sont bien fermés et **agiter vigoureusement pendant 15sec**. Centrifuger (max. 3000rpm) les tubes pour pooler toute la solution. Ne pas répéter cette étape.

10- **Incuber** les plaques d'échantillons pendant **10min à -20°C**.

11- **Centrifuger** les plaques d'échantillons pendant **5min à 6000rpm**.

12- Enlever et jeter les bouchons et transférer délicatement **400µl de chaque surnageant dans une nouvelle plaque à échantillon** à l'aide de cônes 1200µl « extended » BIOHIT.

Attention : Ne pas jeter les billes de tungstène mais les laver à l'eau savonneuse puis à l'alcool et enfin les stériliser au four pasteur à 200°C pendant 1h30.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Axelle ANDRIEUX		
Fonction :	TR		
Visa :			

- 13- Ajouter 1.5volume (généralement 600µl de tampon) APVE à chaque échantillon.
  - 14- Fermer les tubes avec de nouveaux bouchons, s'assurer que les bouchons sont bien fermés et agiter vigoureusement pendant 15sec. Centrifuger (max. 3000rpm) les tubes pour pooler toute la solution. Ne pas prolonger cette étape.
  - 15- Placer la DNeasy 96 plates (membrane) au dessus du S-Block et identifier la DNeasy 96 plates.
- Nettoyage du S-Block : Pour éviter les contaminations, rincer le S-Block après chaque utilisation tout d'abord à l'eau puis incubé 1 min à température ambiante dans une solution d'HCl 0.4M, vider et laver à l'eau distillée.
- 16- Transférer délicatement 1ml de chaque échantillon sur cette membrane à l'aide de la multipipette électronique BIOHIT et des cônes 1200µl "extended" BIOHIT .
  - 17- Fermer la DNeasy 96 plates avec un film protecteur fourni avec le kit " l'AirPore Tape Sheet " (pour éviter les contaminations croisées) et centrifuger 4min à 6000rpm.
  - 18- Enlever et jeter " l'AirPore Tape Sheet " et ajouter précautionneusement 800µl de tampon AW à chaque échantillon.
  - 19- Fermer la DNeasy 96 plates avec un nouveau " AirPore Tape Sheet "(pour éviter les contaminations croisées) et centrifuger 15min à 6000rpm pour assécher la membrane.
  - 20- Enlever et jeter le film protecteur et placer la plaque DNeasy sur la plaque d'éluion (elution microtubes RS) et éluer l'ADN: Ajouter 100µl de tampon AE à chaque échantillon et fermer la plaque avec un film protecteur (airPore Tape Sheets). Incuber pendant 1min à température ambiante (15-25°C). Centrifuger pendant 2min à 6000rpm.
  - 21- Répéter l'étape 20 avec 100µl de tampon AE supplémentaire.
  - 22- Utiliser les bouchons " Caps for Plates " pour fermer les tubes de la plaque d'éluion.

Remarque : L'éluion dans 2\*50µl (au lieu de 2\*100µl) augmente la concentration en ADN mais diminue le rendement total d'ADN.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	Axelle ANDRIEUX		
Fonction :	TR		
Visa :			