

ÉTUDE ET COMPRÉHENSION DES MALADIES FONGIQUES ASSOCIÉES AU DÉPÉRISSEMENT DU NOYER

RAPPORT DE STAGE DE PHYTOPATHOLOGIE

2021-2022

Master Sciences et Technologie de l'Agriculture, l'Alimentation et de
l'Environnement (Master 3A)

Master1 Parcours : **AgroDesign**

Stage encadré par Dr **Yohana LALOUM**

Tutrice pédagogique : Pr **Claire NEEMA**

Etudiant : **Joël Kodzo DROPENOU**

Nom de l'entreprise : **CTIFL, centre opérationnel de Lanxade**

Adresse : 28 route des Nébouts – 34130 PRIGONRIEUX.

REMERCIEMENTS

À ce titre, je tiens à remercier Mme Karima GIRESE, directrice du centre opérationnel de Lanxade, pour son accueil au sein du CTIFL, Mme ZAVAGLI, responsable de l'unité Solution de protection des plantes (SPPL) pour m'avoir accueilli dans l'unité.

Mes remerciements vont à mon maître de stage Mme Yohana LALOUM, pour sa pédagogie, sa disponibilité, sa confiance tout au long du projet. Merci pour tous les conseils avisés à mon égard. Avec Yohana, la rigueur et un travail bien fait étaient au rendez-vous. Merci pour l'attention et les précieux conseils apportés à ce rapport. Ce stage m'a beaucoup appris sur le plan scientifique, et professionnel, merci de m'avoir transmis le sens de la justesse, de la rigueur et de la diplomatie.

Je remercie également Mme Aude MORONVALLE qui m'a assisté et soutenu tout au long de mon stage lors des essais biologiques de pathogénicité et des manipulations au laboratoire. Merci pour tous les conseils, l'aide et l'expertise apportée à mon égard.

De plus, je remercie également l'ensemble du personnel et stagiaire du CTIFL pour leur accueil chaleureux et nos échanges.

Ces quatre mois de stage auront été aussi l'occasion de collaborer avec différentes unités du centre et d'apprendre un peu de tout ce qui se fait sous leurs cieux.

Je voudrais adresser un remerciement particulier à Peter Prince et Ludivine pour leurs aides sans failles dans les collectes de données et tout au long de mon séjour.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

SPPL :	Solution de P rotection des P lantés
CTIFL :	Centre T echnique I nterprofessionnel des F ruits et L égumes
ITS :	I nternal T ranscribed S pacér
LVBM :	Laboratoire de V irologie et de B iologie M oléculaire
CARIBOU :	Développement d' O utils I nnovants de C aractérisation et de détection des <i>Botryosphaeriaceae</i> responsables du Dépérissement du Noyer
CASDAR :	Compte d' A ffection S pécial au D éveloppement A gricole et R ural
LUBEM-UBO :	Laboratoire U niversitaire de B iodiversité et d' E cologie M icrobienne de l' U niversité de B retagne- O ccidentale
ANSES :	Agence N ationale de S écurité Sanitaire de l' A limentation, de l' E nvironnement et du T ravail
FAO :	O rganisation des N ations U nies pour l' A limentation et l' A griculture
PDA:	P otato D extrose A gar
PDA+S:	P otato D extrose A gar + S treptomycine
NB:	Nota B ene
PSM :	P oste de S écurité M icrobiologique
SENuRA :	Station d' E xpérimentation N ucicole de R hône- A lpes
INC :	I nstitut N ational de la C onsommation
Bd :	<i>Botryosphaeria dothidea</i>
Np :	<i>Neofusicoccum parvum</i>

RÉSUMÉ

Un test de pathogénicité permettant d'évaluer le pouvoir pathogène de deux espèces fongiques *Neofusicoccum parvum* et *Botryosphaeria dothidea* appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae* a été réalisé. Huit variants ont été évalués dans le but de (i) confirmer leur pathogénicité ; (ii) d'évaluer la différence d'agressivité entre les deux espèces de champignons (*N. parvum* et *B. dothidea*) et (iii) d'évaluer la différence d'agressivité des 8 variants : *Neofusicoccum parvum* (Np_V1), *Neofusicoccum parvum* (Np_V2), *Neofusicoccum parvum* (Np_V3), *Neofusicoccum parvum* (Np_V4), *Botryosphaeria dothidea* (Bd_V1), *Botryosphaeria dothidea* (Bd_V2), *Botryosphaeria dothidea* (Bd_V3), *Botryosphaeria dothidea* (Bd_V4), tous associés au dépérissement des noyaies en France. Le pouvoir pathogène de ces variants a été mise en évidence sur des plants de noyer (*Juglans regia*) âgé de 2 ans en inoculant un plug de mycélium de l'espèce fongique sur les rameaux préalablement choisis. Ces variants ont induit des nécroses internes et externes de longueur plus ou moins variable se développant à partir du point d'inoculation. Des fructifications ont été observées sur les parties nécrosées et les champignons ont également développé un mycélium caractéristique des *Botryosphaeriaceae*. Quant aux témoins avec blessures ayant reçu uniquement du plug de gélose du complexe eau-agar, aucun symptôme sur les rameaux n'a été observé. Il en est de même pour les témoins intacts. La gravité de l'infection était basée sur l'étendue de la nécrose externe et interne, la vitesse de croissance du champignon, et des lésions internes causée par ces pathogènes. Les résultats ont montré que les variants de *N. parvum*, ont produit des nécroses externes et internes les plus longues, et étaient les plus virulents par rapport aux variants de l'espèce *B. dothidea* qui, à leur tour, ont engendré des nécroses plus ou moins longues. Les différentes espèces mises en évidence ont montré des différences significatives ($P < 0,05$) dans le développement nécroses des externes et internes et le postulat de Koch a permis d'établir une relation de cause à effet entre les variants de champignons inoculés et les nécroses. Ces résultats ont permis de confirmer le pouvoir pathogène de ces espèces fongique, et de mieux appréhender leur différence d'agressivité pour d'éventuelle études et recherches.

Mots clés : Dépérissement du noyer, *Botryosphaeriaceae*, *Neofusicoccum parvum*, *Botryosphaeria dothidea*, test de pathogénicité.

ABSTRACT

A pathogenicity test to evaluate the pathogenicity of two fungal species *Neofusicoccum parvum* and *Botryosphaeria dothidea* belonging to the *Botryosphaeriaceae* family was performed. Eight variants associated with walnut dieback in France were evaluated in order to (i) confirm their pathogenicity; (ii) to compare the aggressiveness between the two fungal species (*N. parvum* and *B. dothidea*) and (iii) evaluate the difference in aggressiveness of the 8 variants: *Neofusicoccum parvum* Np_V1, *Neofusicoccum parvum* Np_V2, *Neofusicoccum parvum* Np_V3, *Neofusicoccum parvum* Np_V4, *Botryosphaeria dothidea* Bd_V1, *Botryosphaeria dothidea* Bd_V2, *Botryosphaeria dothidea* Bd_V3, *Botryosphaeria dothidea* Bd_V4,. Pathogenicity test was performed on 2-year-old walnut (*Juglans regia*) plants by inoculating a mycelium plug on previously selected shoots. These variants induced internal and external necrosis of variable length developing from the point of inoculation on the twigs. Fruiting bodies were observed on the necrotic parts and the fungi also developed a mycelium characteristic of *Botryosphaeriaceae*. In control shoots that received only water-agar plug, no symptoms on the twigs were observed, and the same was true for the intact controls. The severity of infection was based on the extent of external and internal necrosis, the growth rate of the fungus, and the internal lesions caused by these pathogens. The results showed that the variants of *N. parvum*, produced the longest external and internal necrosis, and were the most virulent compared to the variants of the species *B. dothidea*, which, in turn, generated necrosis of varying lengths. The different species showed significant differences ($P < 0.05$) in the development of external and internal necrosis, and Koch's postulate allowed to establish a cause-and-effect relationship between the variants of the inoculated fungi and the necrosis. These results confirm the pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* fungal species, and to better understand their difference in aggressiveness for further study and research.

Key words: pathogenicity, aggressiveness, variants, necrosis, *Botryosphaeriaceae*, *Neofusicoccum parvum*, *Botryosphaeria dothidea*.

GLOSSAIRE

Dépérissement : Le dépérissement se manifeste par une altération durable dans le temps et dans l'espace de l'aspect extérieur des arbres. Cette altération peut s'avérer mortelle aux organes pérennes, réduire la qualité et la quantité du feuillage en inhibant la croissance de la plante.

Inoculum : Échantillon qui contient des germes vivants que l'on introduit dans un milieu favorable en vue de sa multiplication ou de son identification.

Mycélium : ensemble des hyphes ou filaments d'un champignon ou organisme fongiforme.

Saprophyte : vivant aux dépens de la matière organique plus ou moins décomposée.

Agressivité : composante quantitative du pouvoir pathogène d'un micro-organisme.

Témoins blessure : rameau témoin dont une partie de l'écorce coupée au scalpel destiné à recevoir avec un plug de gélose sans mycélium.

Témoin Intact : Rameau sans plug de gélose ni du mycélium.

Pathogènes : un facteur susceptible d'engendrer une maladie, en particulier un germe capable de déterminer une infection (Bacille, microorganisme, staphylocoque, virus pathogène.).

Infection : contamination du tissu sain par le mycélium des variants du projet.

Inoculation : action de dépôt du mycélium des variants fongiques sur le tissu sain d'un hôte.

Marge de croissance active : frontière entre la gélose et le mycélium en croissance, les plugs en marge de croissance active ne sont pas forcément entièrement recouverts de mycélium.

Nécrose des rameaux : correspond à un tissu (écorce, cambium,) qui présente une coloration marronne causée infection par un champignon.

Vergers : Terrain de plus ou moins grande importance plantée d'arbres fruitiers d'une ou de plusieurs variétés.

Changement climatique : Toute modification durable du climat au niveau planétaire due à une augmentation des concentrations de gaz à effet de serre (CO₂, mais aussi méthane par exemple) dans l'atmosphère. C'est également l'ensemble des variations des caractéristiques climatiques en un endroit donné au cours du temps : réchauffement ou refroidissement.

Gestion durable des agrosystèmes : Assurer les besoins de l'humanité tout en limitant ou en compensant les impacts environnementaux. Cette gestion durable s'appuie sur des connaissances et des technologies en agronomie et en écologie.

TABLE DES MATIÈRES

Partie I : INTRODUCTION ET CONTEXTE DU PROJET DE RECHERCHE.....	1
1.1 La filière du noyer en France : problématiques phytosanitaires rencontrées.....	1
1.2 Présentation de l'établissement d'accueil.....	2
1.3 Le projet de recherche CARIBOU : élaner la recherche pour cerner le dépérissement du noyer	3
1.4 Objectifs du stage : étude de la pathogénicité des <i>Botryosphaeriaceae</i>	3
Partir II : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
2.1 Classifications botaniques du noyer	5
2.2 : Description de la noix	6
2.3 La production de la noix.....	7
2.4 Présentation de la famille des <i>Botryosphaeriaceae</i>	8
2.5 Cycle de développement des champignons de la famille des <i>Botryosphaeriaceae</i>	9
Partie III : MATÉRIELS ET MÉTHODES	10
3.1. Description du matériel utilisé.....	10
3.1.1 Matériel végétal.....	10
3.1.2 Espèces fongiques étudiées	11
3.1.3 Matériels de laboratoire.....	11
3.2 Protocole expérimental des tests de pathogénicité réalisés sur plants de noyers en serre	12
3.2.1 Présentation des modalités : plan expérimental	12
3.2.2 Méthode d'identification des rameaux.....	13
3.2.3 Préparation de l'inoculum.....	13
3.2.4 Méthode d'inoculation.	14
3.2.5 Notations et lecture des résultats des tests	15
3.2.6 Analyse des résultats.....	15
3.3 Essai N°2 : Test de pathogénicité sur rameau des jeunes plants de noyer	15
3.3.1 Objectifs de l'essai N°2.....	15
Partie IV : RÉSULTATS	17
4.1 Étude la pathogénicité des espèces <i>B. dothidea</i> et <i>N. parvum</i> (comparaison interspécifique)	17

4.1.1 : Description des résultats des modalités M4 : test de pathogénicité de <i>N. parvum</i>	18
4.1.2 : Description des résultats des modalités M8 : test de pathogénicité de <i>B. dothidea</i>	18
4.1.3 Comparaison de l'agressivité des espèces <i>B. dothidea</i> et <i>N. parvum</i>	20
4.2 : Étude la pathogénicité des espèces <i>B. dothidea</i> et <i>N. parvum</i> (comparaison interspécifique), essai n°2.	20
4.2.2 : Description des résultats des modalités M2 : test de pathogénicité de <i>B. dothidea</i>	20
4.2.3 : Description des résultats des modalités M3 : tests de pathogénicité de <i>N. parvum</i>	20
4.2.4 comparaison interspécifique des espèces <i>B. dothidea</i> et <i>N. parvum</i>	21
4.3 Étude la pathogénicité des variants de <i>B. dothidea</i> et <i>N. parvum</i> (intraspécifique)	21
4.3.1 : Description des résultats des modalités M3, M5, M6 (<i>N. parvum</i> : (V1, V3 et V4) : comparaison intraspécifique	21
4.3.2 : Description des résultats des modalités M7, M9, M10 <i>B. dothidea</i> : V1, V3 et V4 : comparaison intraspécifique	22
4.3.3 Comparaison de l'agressivité des variants <i>B. dothidea</i> et <i>N. parvum</i> (intraspécifique).....	22
4.4 Postulat de Koch.....	23
Partie V : DISCUSSION	25
5.1 Confirmation de la pathogénicité de <i>B. dothidea</i> et <i>N. parvum</i>	25
5.2 Différence observée entre les nécroses externes et internes.....	25
5.3 Différence d'agressivité entre les espèces <i>B. dothidea</i> et <i>N. parvum</i>	25
5.3. Différence d'agressivité entre les variants de <i>B. dothidea</i> et <i>N. parvum</i>	26
5.4 Confirmation de la relation de cause à effet	26
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	27
Bibliographie	I
Webographie	II
Annexe	III

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Localisation des centres et antennes du CTIFL sur le territoire français	2
Figure 2 : Le deux principaux bassins de production de noix en France.....	4
Figure 3 : verger, plant et aspect botanique du noyer	5
Figure 4 : Coupe longitudinale d'une noix représentant les différentes parties	6
Figure 5 : Productions moyennes mondiales de noix par pays en t/an	8
Figure 6 : Schéma du cycle biologique du dépérissement sur rameaux du noyer d'après López-Moral et al 2020	9
Figure 7 : Matériel végétal (jeunes plants de noyer).....	10
Figure 8 : variants fongiques <i>N. parvum</i> et <i>B. dothidea</i> des deux espèces ayant servi d'inoculum pour les tests de pathogénicité.....	11
Figure 9 : Plan expérimental des deux essais	12
Figure 10 : Préparation de l'inoculum ayant servi au test de pathogénicité.....	14
Figure 11 : Étapes d'inoculations	14
Figure 12 : Longueur des nécroses internes et externes par modalités.....	17
Figure 13 : a - Plant de la modalité témoin blessé ne présentant aucun symptôme de nécrose sur les organes ; b - Plants des modalité infectés présentant toutes, les symptômes foliaires et des nécroses sur les rameaux.	18
Figure 14 : c - nécrose causée par les Botryosphaeriaceae sur rameau de noyer in planta ; d - rameau de noyer du Témoin blessé ne présentant aucun signe de nécrose ; e - nécrose externe sur rameau détaché ; f - nécrose interne sur rameau détaché ; g - Rameau détaché Tb (pas de nécrose); h - Section longitudinale d'un rameau Tb ne présentant aucun signe de nécrose interne.....	19
Figure 15 : Taille moyenne des nécrose externe et interne des espèces <i>N. parvum</i> et <i>B. dothidea</i> (Modalité M2, M4 et M8).....	20
Figure 16 : Taille moyenne des nécrose externe et interne des espèces <i>N. parvum</i> et <i>B. dothidea</i> (Modalités M1, M2 et M3 (essai 2).....	21
Figure 17 : Taille moyenne des nécroses externe et internes en fonction des variant fongiques	22
Figure 18 : Champignons réisolés à partir de la nécrose des rameaux des plants de noyer	24
Figure 19 : courbe des températures moyennes quotidiennes recueillies au cours de l'essai	III
Figure 20 : a - conidies observés sur rameau nécrosé. b - Foliole nécrosée.....	III

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les variants des deux espèces fongiques et leurs origines répartis par modalités	11
Tableau 2 : Matériel de laboratoire et outils utilisés lors de la mise au point du test de pathogénicité	12
Tableau 3 : Description des modalités M1 à M10 en fonction des questions de recherche	12
Tableau 4 : Fréquences d'isolement des espèces fongique.....	23
Tableau 5 : Longueur externe et interne moyenne des nécroses en fonction des variants et modalités des deux essais.....	III

Partie I : INTRODUCTION ET CONTEXTE DU PROJET DE RECHERCHE

1.1 La filière du noyer en France : problématiques phytosanitaires rencontrées

L'agriculture connaît une grande modernisation et évolution depuis un demi-siècle. Cette évolution visait principalement à augmenter les rendements et la productivité dans le but de répondre au besoin nutritionnel sans cesse croissant de la population mondiale. Tous les domaines d'activité (grandes cultures, arboriculture fruitière, etc...) ont été concernés. En parallèle à cette hausse de production, la filière nucicole gagne également du terrain dans de nouvelles zones de culture en France. Avec l'augmentation annuelle de la production de noix et des superficies, nous assistons à la recrudescence de certaines maladies et l'émergence de nouvelles maladies. L'impact économique de ces maladies est devenu depuis 2015 un facteur limitant de la production des fruits dans de nombreux pays du monde, dont la France. Les arbres fruitiers sont menacés par des maladies d'origine fongiques dont la plupart occasionnent des dégâts non-négligeables auprès des arboriculteurs. Ce problème touche principalement la France, qui depuis 2015, voit sa production de noix confrontée au phénomène de dépérissement observé dans les deux principales zones de production nucicoles. L'expression des symptômes engendrés par le dépérissement est communément associée au développement de différents champignons pathogènes dans les noyers.

Le dépérissement causé par des espèces fongiques est une maladie qui affecte le tronc, les rameaux, et qui entrave les qualités intrinsèques des noix. Il se manifeste par le développement de symptômes au niveau des organes (fruits, braches, tronc) de l'arbre. Il se caractérise par des formes plus ou moins sévères allant de l'affaiblissement progressif de la plante jusqu'à la perte du feuillage en passant par la perte de vigueur, pour aboutir à la mort des branches, puis la plante entière. Les travaux de recherche entrepris par les acteurs de la filière ont permis d'identifier dans deux bassins de production de noix, des espèces fongiques appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae*, comme des agents causaux associés au dépérissement du noyer. Bien que d'importants efforts et progrès aient été réalisés dans l'élucidation de l'étiologie de ces maladies, les connaissances scientifiques sur les facteurs déclenchant les dépérissements restent limitées (Moral *et al.*, 2019).

Face à la réapparition de symptômes sur branches, fruits et troncs associés à la mortalité massive des noyeraies françaises, des programmes de recherche voient le jour. Dans le but de conserver la production nucicole française compétitive, dans un contexte de changement climatique et de transition agroécologique, il est essentiel de mettre en place une gestion durable des pathogènes responsables du dépérissement, avec des leviers permettant de réduire drastiquement la pression de ces agents causaux.

Notre étude s'inscrit dans l'un des projets d'étude en cours qui permettront d'étudier, de comprendre la biologie des espèces et de faire le lien entre agents infectieux et symptômes.

1.2 Présentation de l'établissement d'accueil

Créé en 1952, le Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes (CTIFL) est un organisme de recherche appliquée référent de la filière fruits et légumes française. Il est composé d'un siège à Paris, de deux antennes régionales Rungis (94) et Nancy (54)) et de quatre centres opérationnels basés à Balandran (30), Lanxade (24), Carquefou (44) et Saint Rémy de Provence (13)). De par ses travaux et ses innovations, le CTIFL œuvre au développement et à la diversification des modes de production et de commercialisation de chacun des acteurs. Le CTIFL dispose d'un budget annuel de 25 millions d'euros dont les deux tiers sont financés par les professionnels de la filière fruits et légumes rassemblés au sein de l'interprofession des fruits et légumes (Interfel). Les autres sources du budget proviennent de fonds publics (FranceAgriMer, Union européenne, régions, départements, etc.) ou privés (formations, prestations de services, ventes de publications, ventes de plants et semences). Un total de 288 salariés travaille au sein du CTIFL dont 181 ingénieurs et techniciens. À ces chiffres, viennent s'ajouter des saisonniers, des doctorants et des stagiaires (CTIFL, 2018).

Pour atteindre ses objectifs, le CTIFL mène des programmes d'expérimentation et de recherche, propose une activité de conseil, développe des démarches d'innovation de formations et d'analyse et assure une activité de certification et de diffusion de l'information auprès des professionnels. Le CTIFL participe également aux progrès scientifiques et techniques et favorise le transfert de nouvelles technologies et méthodes aux entreprises de la filière. La partie Recherche et expérimentation est réalisée en partenariat avec une trentaine de stations d'expérimentation régionales et des universités française et européenne. L'activité de Recherche s'articule autour de plusieurs unités de travail traitant des questions liées à l'évolution des modes de consommation des fruits et légumes, à la réduction de l'utilisation des énergies fossiles sous serre, à l'automatisation et mécanisation. L'unité SPPL est spécialisée dans l'étude de la santé des plantes avec pour missions principales la recherche d'alternative aux produits phytopharmaceutiques, le développement de solution de biocontrôle ainsi que la compréhension des principales maladies des filières fruits et légumes.

Le centre de Lanxade est situé dans la vallée de la Dordogne, soit au cœur du bassin de production du Sud-Ouest. Le domaine dispose de 80 hectares et compte une soixantaine de collaborateurs. Il comporte des laboratoires d'analyses (le Laboratoire de Virologie et Biologie moléculaire (LVBM)) ainsi que le laboratoire de Phytopathologie) et de nombreux équipements spécialisés (station automatisée de gestion de l'irrigation, centrale d'acquisition de mesure climatique sous serre). Les principaux sujets de recherche portent sur l'arboriculture pommier, noyer, poirier, les techniques de protection intégrées visant à prévenir les maladies, la protection de l'environnement et la certification de matériel végétal. L'unité SPPL dans laquelle j'effectue mon stage étudie davantage les maladies liées à la production fruitière et maraîchère. Elle mène ses travaux avec une approche agroécologique, et s'intéresse de ce fait particulièrement à l'étude et la compréhension du développement des maladies en verger.



Figure 1 : Localisation des centres et antennes du CTIFL sur le territoire français

1.3 Le projet de recherche CARIBOU : élaner la recherche pour cerner le dépérissement du noyer

Le projet CASDAR RT CARIBOU porte sur le développement d'Outils innovants de Caractérisation et de détection des Botryosphaeriaceae responsables du Dépérissement du Noyer.

Il s'agit d'un projet de recherche de 18 mois financé par le ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation. Il est porté et coordonné par le CTIFL en partenariat avec la station Expérimentale de Creysse (46), la SENUA qui est la Station d'Expérimentation Nucicole de Rhône-Alpes (38) et le LUBEM-UBO qui est le Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie microbienne de l'Université de Bretagne occidentale.

Le projet CARIBOU vise à mieux comprendre la répartition géographique des *Botryosphaeriaceae* dans les deux bassins de production français tout en développant des méthodes d'identifications spécifiques par des techniques de biologie moléculaire. Démarré en janvier 2021, le projet CARIBOU est clôturé depuis le 30 juin 2022. Durant toute la vie du projet, l'ensemble des partenaires ont travaillé sur les trois grandes actions suivantes :

Action 1 : L'identification et la caractérisation des espèces présentes en France dans les deux principaux bassins de production (Sud-Ouest et Sud-Est) sur 12 parcelles préalablement sélectionnées en 2020.

Action 2 : La mise au point d'outils de détection spécifiques et rapides par analyse moléculaire, innovants, fiables et validés sur le terrain, pour être transférables aux laboratoires spécialisés et équipés.

Action 3 : La coordination et valorisation des résultats auprès de la profession et du monde scientifique et technique par l'organisation des réunions et des comités de pilotages.

Durant la vie du projet, trois campagnes de prélèvements en vergers ont été réalisées entre septembre 2020 et août 2021 et comptabilise au total plus de 300 échantillons analysés. Les fruits ont été prélevés en septembre 2020 et août 2021 tandis que les rameaux ont été échantillonnés en mai 2021 uniquement. Pour chacune des 12 parcelles du projet, 12 organes végétaux symptomatiques et 3 asymptomatiques ont été sélectionnés afin de comparer les communautés fongiques présentes dans ces deux types d'échantillons. Les analyses réalisées sur les 300 échantillons de rameaux et de fruits récoltés en vergers ont permis d'identifier la présence de deux espèces de *Botryosphaeriaceae* sur les deux bassins de production de la noix, à savoir *Botryosphaeria dothidea* et *Neofusicoccum parvum*. Afin de confirmer la corrélation entre les symptômes de dépérissement et la présence de ces deux espèces, l'objectif de ce stage a consisté à réaliser des tests de pathogénicité en serre.

1.4 Objectifs du stage : étude de la pathogénicité des *Botryosphaeriaceae*

Ce stage est axé sur l'Action 1 du projet CARIBOU, qui consiste en l'identification et la caractérisation des espèces de la famille des *Botryosphaeriaceae* dans les noyeraies françaises. L'objectif du stage se divise en trois grandes questions :

Il s'agira de :

- i. Mettre au point un test de pathogénicité en conditions semi-contrôlées sur les jeunes plants de noyer.

- ii. Confirmer la pathogénicité des espèces fongiques isolées dans l’Action 1 du projet, à savoir *N. parvum* et *B. dothidea*.
- iii. Comparer la différence d’agressivité entre les deux espèces *N. parvum* et *B. dothidea*, (comparaison interspécifique) et comparer la différence d’agressivité entre les variants d’une même espèce (comparaison intraspécifique).

Principaux Bassins de production de noix en France

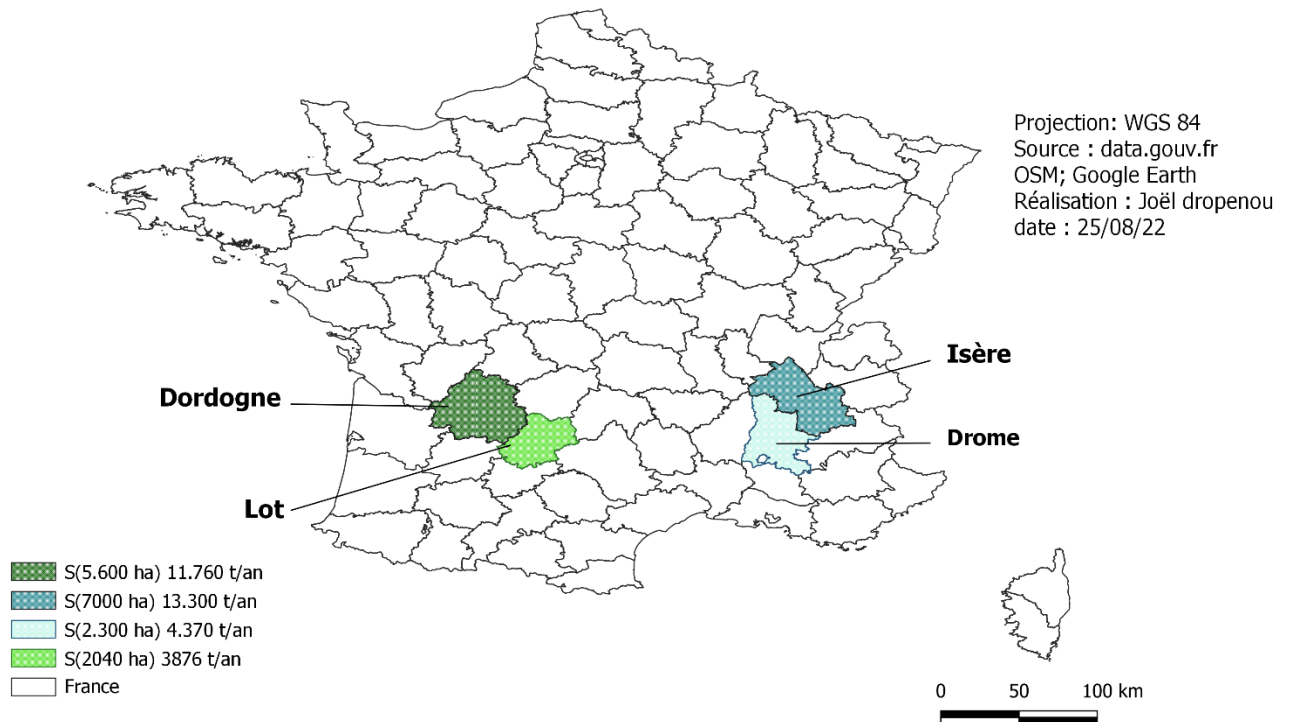


Figure 2 : Le deux principaux bassins de production de noix en France

Source : Agreste 2016-élaboration France AgriMer.

Partir II : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Classifications botaniques du noyer

Le noyer commun du nom scientifique (*Juglans regia* L.) est un arbre fruitier et forestier à feuilles caduques qui peut atteindre jusqu'à 25 à 30 m de hauteur avec une longévité moyenne de 100 ans et plus (Gallais and Bannerot, 1992). C'est une espèce de grande importance, du fait que ses fruits, son bois, son écorce et ses feuilles trouvent une large utilisation dans la vie quotidienne. Exemple1 : usages médicaux des feuilles en raison de leur forte teneur en juglandine ; exemple2 : usage artistique du bois en ébénisterie. (Bonev, 1973).

L'espèce *Juglian regia* appartient à la famille des *Juglandaceae*. Cette famille forme à elle seule un ordre, celui des *Juglandales* qui regroupe les genres *Juglans* L., *Carya* Nutt., *Pterocarya* Kunth et *Platycarya* Sleb.et Zucc. (Rehder, 1947).

Le noyer est cultivé principalement pour ses noix. Les feuilles, imparipennées, longues de 25 à 40 cm sont généralement constituées par un petit nombre de folioles (7 à 9). La foliole terminale est la plus grande et la paire de folioles basale la moins développée (Garavel, 1959). L'arbre du noyer est caractérisé par des rameaux à moelle lamellée et donne des fruits à coque lignifiée plus ou moins sillonnés et rugueux, enfermés dans une enveloppe charnue (le brou) (Manning, 1978).



Figure 3 : verger, plant et aspect botanique du noyer

2.2 : Description de la noix

La noix est une drupe indéhiscente, charnue, à un noyau qui ne s'ouvre pas naturellement à maturité. La noix se compose d'une enveloppe " le brou" entourant une coquille. La graine occupe la plus grande partie du fruit, avec une coquille relativement mince et comestible, avec une saveur riche. Elle dispose, d'une coque scléreuse, renfermant une amande huileuse, 'le cerneau' (Germain, E., Jalinat, J., & Marchou, M., 1975).

i. Le brou

Le brou est la partie charnue verte qui enveloppe la noix. Il a pour origine la partie externe de l'ovaire. Son épaisseur moyenne est de 4 mm. À maturité, il se fend, s'ouvre et libère la noix. Le brou n'est pas comestible, mais peut aussi servir à teinter le bois et les cheveux. Sa richesse en tannin lui confère un usage artistique, et cosmétique.

ii. La coque

La coque est l'enveloppe dure (endocarpe lignifié) de la noix, sous le brou. Elle est formée de deux valves symétriques accolées. L'aspect de la coque n'est parfaitement pas lisse et l'intérieur présente dans la plupart des cas une surface rugueuse. Elle a une épaisseur qui varie selon la variété et un poids moyen de 40 à 65% du poids total de la noix (Gallais and Bannerot, 1992). Les coques rentrent dans la fabrication du compost si elles sont broyées. Elles peuvent servir de drainage dans les pots de fleurs et sont vouées à d'autres usages également.

iii. Le cerneau

Partie comestible de la noix, le cerneau se présente sous forme d'une amande remplissant la quasi-totalité de la noix. Il se compose de lobes divisés par la cloison primaire. Il représente de 35 à 60% du poids de la noix sèche.

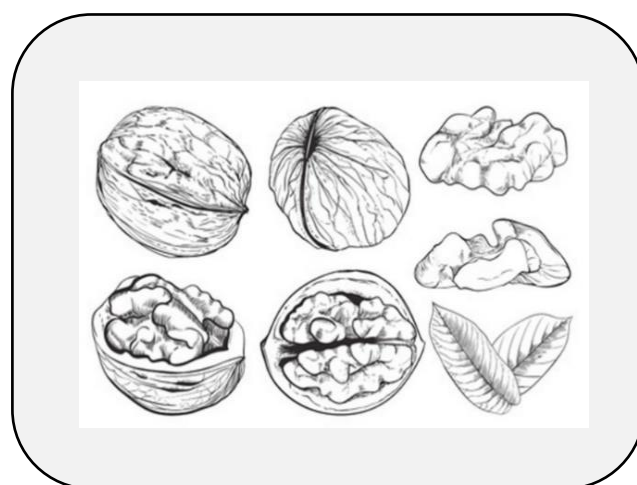
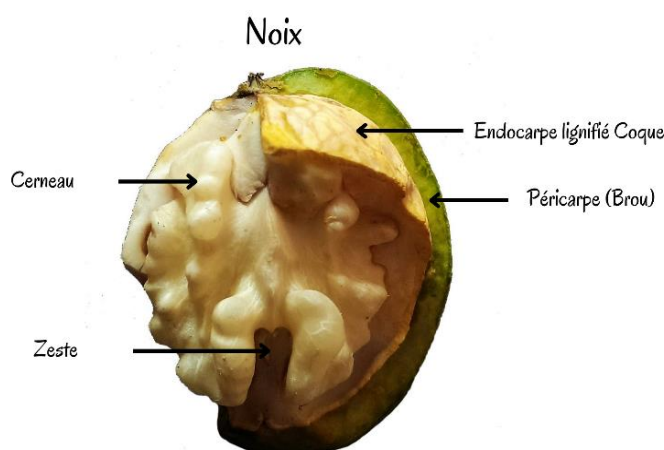


Figure 4 : Coupe longitudinale d'une noix représentant les différentes parties

iv. Valeurs nutritionnelles de la noix

Se distinguant des autres fruits par ses propriétés médicinales et son contenu particulièrement élevé en nutriments, la noix est un aliment fibreux riche en protéines, acides gras monoinsaturés et polyinsaturés. Elle a également une composition centésimale importante en vitamines E et K, et en des minéraux tels que le magnésium, le potassium, etc. La noix contient également de la mélatonine, une molécule antioxydante¹ qui régule le cycle biologique du corps humain (Ambroise-Thomas, 1998). Selon l'Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES), la noix fait partie des graines oléagineuses avec plus de forte concentration d'oméga 3. La consommation régulière de noix aurait un effet avantageux dans la prévention des maladies cardiovasculaires, la réduction du stress, minimise les risques d'inflammations, de l'adiposité viscérale, l'hyperglycémie, et participe à la résistance à l'insuline (De Souza *et al.*, 2017). C'est aussi une bonne source de composés phénoliques (principalement localisés dans le tégument de la graine) parmi lesquels l'acide ellagique² et l'acide gallique.

2.3 La production de la noix

En 2018, la production mondiale de noix en coque était de 2 000 000 tonnes, soit l'équivalent de 880.000 tonnes d'amandes avec une augmentation annuelle moyenne de 4% enregistrée (Sorrenti, 2019). Selon les données les plus récentes de la FAO et de l'INC 2019 à l'échelle mondiale, la Chine est le principal pays producteur, dont les volumes dépassent 800 000 tonnes par an. Elle est suivie par les États-Unis (626 000 t). L'Iran et l'Ukraine viennent respectivement en quatrième et cinquième position avec une production moyenne annuelle dont le volume dépasse 120 000 tonnes chacun. Loin derrière, se positionne l'Inde, la Roumanie, la Moldavie, la Turquie, l'Italie, la Hongrie, l'Australie, la Géorgie dont la production est inférieure à 15 000 tonnes.

La France occupe la sixième place mondiale derrière l'Ukraine avec plus de 35 000 tonnes/an. Elle se situe au 2^{em} rang mondial derrière les États-Unis pour les exportations de noix coques suivie de près par le Mexique, l'Ukraine et le Chili pour le cerneau notamment (Lot, 2020). La France est aujourd'hui la plus grande productrice européenne. La production française, avec une superficie totale de plus de 22.000 ha est principalement répartie sur deux régions à savoir le Sud-Est, plus précisément en Isère et dans la Drôme avec près de 50% de la production annuelle et Sud-Ouest de la Dordogne, le Lot et la Corrèze. La noyeraie française est devenue de ce fait, en 2019 le deuxième verger français en termes de superficie derrière la pomiculture.

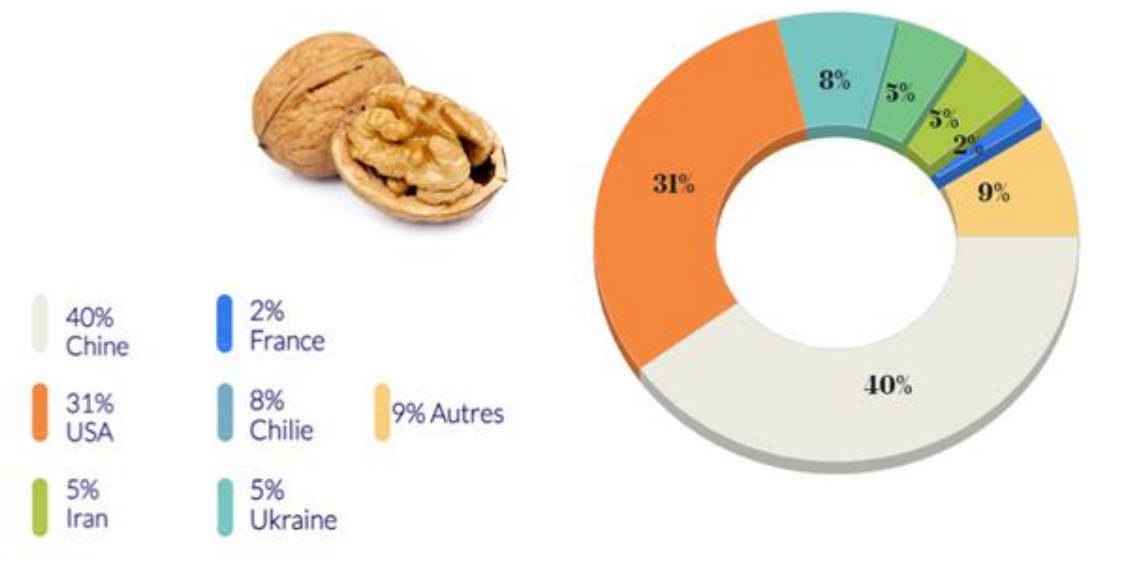
Cependant depuis 2015, la production nucicole française est confrontée à une grande contrainte phytosanitaire due à la recrudescence de dépérissement des noyers dans les principaux bassins de productions. Ce problème de dépérissement est associé à des maladies provoquant des chancres, des nécroses à la surface des fruits, et dans les cas les plus sévères, la mortalité de l'arbre.

En France, de récents travaux de recherche ont révélé la présence des *Botryosphaeriaceae* dans les deux bassins de production de la noix, associée à une recrudescence de dépérissement de rameaux. À l'échelle mondiale, l'augmentation des cas de dépérissement depuis les années 2000 suscite de grandes inquiétudes (Moral *et al.*, 2019).

1

² Polyphénol* au fort pouvoir antioxydant. La consommation d'antioxydants est fondamentale car ils contribuent à prévenir les maladies

Production (ooo t) de noix (cerneaux) et contribution en pourcentage dans les principaux pays. INC 2019



2.4 Présentation de la famille des *Botryosphaeriaceae*

Figure 5 : Productions moyennes mondiales de noix par pays en t/an

Les travaux de recherches de Pusey *et al.*, en (2015) et Slippers *et al.*, 2017 ont identifié les espèces fongiques appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae* comme étant des agents causaux de plusieurs symptômes de maladie des arbres fruitiers. Les *Botryosphaeriaceae* sont des pathogènes opportunistes de nombreuses espèces ligneuses, qui s'expriment après un stress subit par l'hôte. Morphologiquement très diversifiées, les *Botryosphaeriaceae* comprennent une large gamme de champignons endophytes, saprophytes, ou encore pathogènes, qui se développent principalement sur des hôtes ligneux. On les retrouve dans toutes les zones géographiques et climatiques du monde, à l'exception des régions polaires (Blancard et lecomte, 2014).

i. Classification phylogénétique des *Botryosphaeriaceae*

Les *Botryosphaeriaceae* sont une famille de champignons appartenant à la classe des ascomycètes comprenant de nombreuses espèces pathogènes de plantes d'intérêt économique tels que le noyer le châtaignier, la vigne, etc.). Ils ont été décrits pour la première fois par Theissen & Sydow en (1918) comme une sous-famille de la famille des *Pseudosphaeriaceae*. Li *et al.*, (2016) et Liu *et al.*, (2012), dans leurs travaux de recherches, ont identifié et caractérisé sur la base de critère morphologique, 29 genres comme appartenant à cette famille. Un an après les travaux de Liu *et al.*, 78 genres appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae* ont été recensé (www.mycobank.org).

Cependant, après analyse phylogénétiques et morphologiques, Phillips *et al.*, (2013) redéfinissent le nombre de genres et d'espèces qui est passé à 17 genres et 110 espèces.

ii. Caractéristique des *Botryosphaeriaceae*

Les espèces fongiques de la famille des *Botryosphaeriaceae* sont pathogènes, surtout sur les plantes ligneuses. Ils ont été caractérisés principalement sur la base de leurs ascospores cloisonnées, ovoïdes et hyalines. Elles sont dotées des ascospores cloisonnées, ovales et transparentes. (Sivanesan, 1984)

Les caractéristiques varient vis-à-vis des genres. Par exemple, le genre *Dothiorella* se caractérise par des ascospores de couleur, brunes de forme ellipsoïde et souvent septées dans l'asque. D'autres encore comme les genres *Lasiodiplodia* sont caractérisés par des mycéliums bruns, ramifiés et cloisonnés avec de jeunes ascospores transparentes. Quant à *Botryosphaeria* et *Neofusicoccum*, ils sont souvent confondus entre eux, car ils sont similaires morphologiquement (Slippers *et al.*, 2004).

2.5 Cycle de développement des champignons de la famille des *Botryosphaeriaceae*

Chez les *Botryosphaeriaceae*, la reproduction asexuée est le mode de reproduction le plus répandu (Phillips, 2002; van Niekerk *et al.*, 2004; Baskarathevan *et al.*, 2012). Les espèces de *Botryosphaeriaceae* sont considérées comme des agents pathogènes latents (i.e), le champignon peut facilement passer inaperçu lors des mises en quarantaine des plantes hôtes. Ces champignons s'expriment généralement après des épisodes des stress de la plante, infectent cette dernière en engendrant des symptômes de la maladie caractéristique (la nécrose du brou, du bois, l'alopécie de la plante, voire la mort totale de l'arbre). Les *Botryosphaeriaceae* ont la capacité de vivre sous la forme de saprophyte au cours de leur cycle de vie. Lors de leur phase saprophytique, ils peuvent survivre pendant un long moment sur des débris ligneux ou des parties inertes de la plante sur lesquels ils produisent des formes de conservation (Phillips, 2002). Ces pathogènes, pour infecter leur hôte, profitent des stress abiotiques de la plante à savoir de fortes températures dites extrêmes, la sécheresse ou des dommages physiques tels que : les plaies de taille et le greffage de l'hôte (Phillips, 2002; Slippers and Wingfield, 2007; Marsberg *et al.*, 2017).

Les conditions climatiques jouent un rôle important dans la sporulation et la dispersion des ascospores et des conidies telles qu'une forte humidité, des épisodes pluvieux, venteux ou une dissémination par les insectes (Valencia *et al.*, 2015). Ces agents pathogènes ont la capacité de survivre sur des cultures en passant l'hiver et l'été sous forme de pycnides³. Le processus de préinfection est déclenché une fois que les ascospores se posent sur les tissus sensibles d'un hôte, ils déclenchent plusieurs processus tels que l'adhésion, la germination des spores et la reconnaissance de l'hôte.

Le schéma ci-dessous présente les différentes étapes du cycle biologique des *Botryosphaeriaceae*.

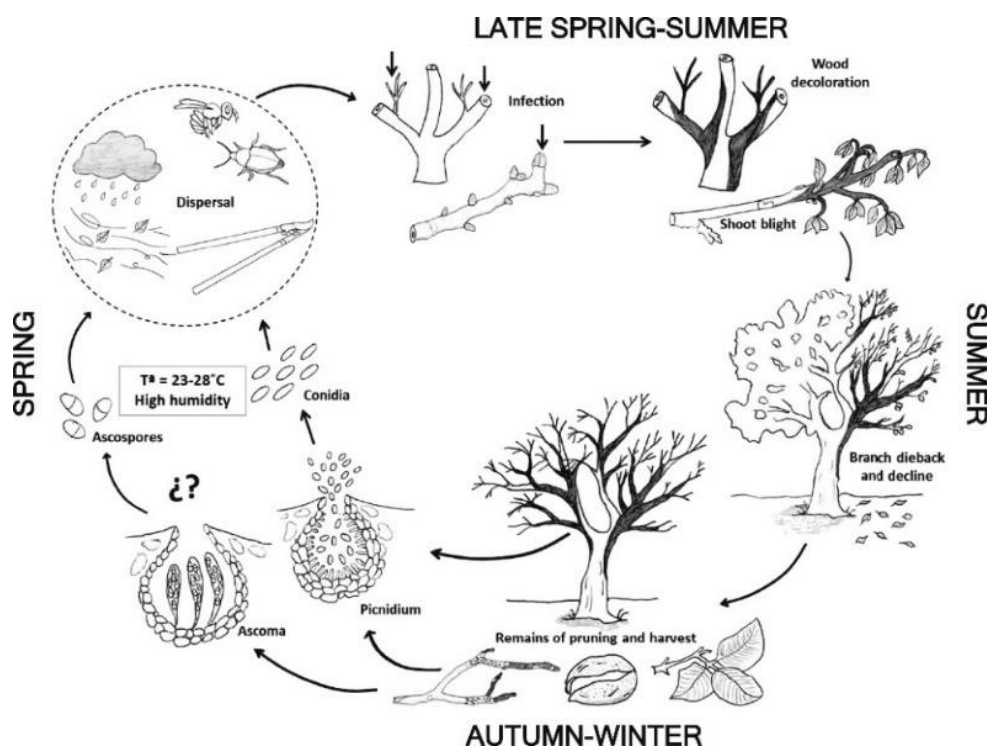


Figure 6 : Schéma du cycle biologique du dépérissement sur rameaux du noyer d'après López-Moral *et al* 2020

³ Pycnides : Cavité d'un champignon contenant des filaments porteurs de spores formée par des filaments densément serrés

Partie III : MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1. Description du matériel utilisé

Dans le but de confirmer la pathogénicité des espèces fongiques de la famille des *Botryosphaeriaceae*, un test de pathogénicité a été effectué. Pour se faire, une méthodologie inspirée de celle de López-Moral *et al.*, (2020) a été adoptée.

3.1.1 Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cet essai est constitué des jeunes plants de noyers âgés de 2 ans. Issus de la pépinière COULIE, ils ont été empotés et disposés sur une banquette dans un module de serre à 25°C. Les plants et leurs rameaux ont été identifiés avec des étiquettes en fonction des modalités de l'essai.



Figure 7 : Matériel végétal (jeunes plants de noyer)

3.1.2 Espèces fongiques étudiées

Les tests de pathogénicité sont réalisés avec les deux seules espèces de *Botryosphaeriaceae* isolées dans les deux principaux bassins de production, à savoir : *Botryosphaeria dothidea* et *Neofusicoccum parvum*.

Parmi l'ensemble des 1534 isolats identifiés dans le cadre du projet CARIBOU, 134 ont été identifiés comme appartenant à l'espèce *B. dothidea* et 213 à l'espèce *N. parvum*. Les isolats ont ensuite été classés par variants selon des approches de biologie moléculaire. Les variants ont été obtenus en regroupant les isolats en fonction des séquences génétiques amplifiées lors de l'identification taxonomique par séquençage Sanger. En d'autres termes, tous les isolats ayant les mêmes séquences génétiques ont été considérés comme appartenant au même variant. Ainsi, la pathogénicité des quatre variants majoritaires appartenant aux espèces *B. dothidea* et *N. parvum* a été étudiée de façon indépendante (cf tableau1).

Les variants sont conservés en boîtes de Petri à 25°C sur du milieu nutritif Potato Dextrose Agar (PDA) complémenté en sulfate de streptomycine. Le milieu est constitué des éléments suivants : dissolution de 39g de PDA dans 1L d'eau déminéralisée puis stérilisés 15 min à 121 °C à l'autoclave. 100 mg de sulfate de streptomycine sont ajoutés après refroidissement du milieu. Le milieu est ensuite coulé dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre.

Tableau 1 : Les variants des deux espèces fongiques et leurs origines répartis par modalités

Origine de l'variant	Espèces fongiques	N° de la parcelle d'origine	N° du variant ITS	Modalité
SUD-OUEST	<i>Neofusicoccum parvum</i>	P12R4I1	MN904795	M3
SUD-OUEST	<i>Neofusicoccum parvum</i>	P7R5I5	MT587452	M4
SUD-EST	<i>Neofusicoccum parvum</i>	P5R6I3	MN904795	M5
SUD-EST	<i>Neofusicoccum parvum</i>	P3R15I3	MT587452	M6
SUD-OUEST	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	P8R6I3	MH992669	M7
SUD-OUEST	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	P10R7I1	MT177925	M8
SUD-EST	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	P4R10I4	MT177925	M9
SUD-EST	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	P1R12I2	MH992669	M10

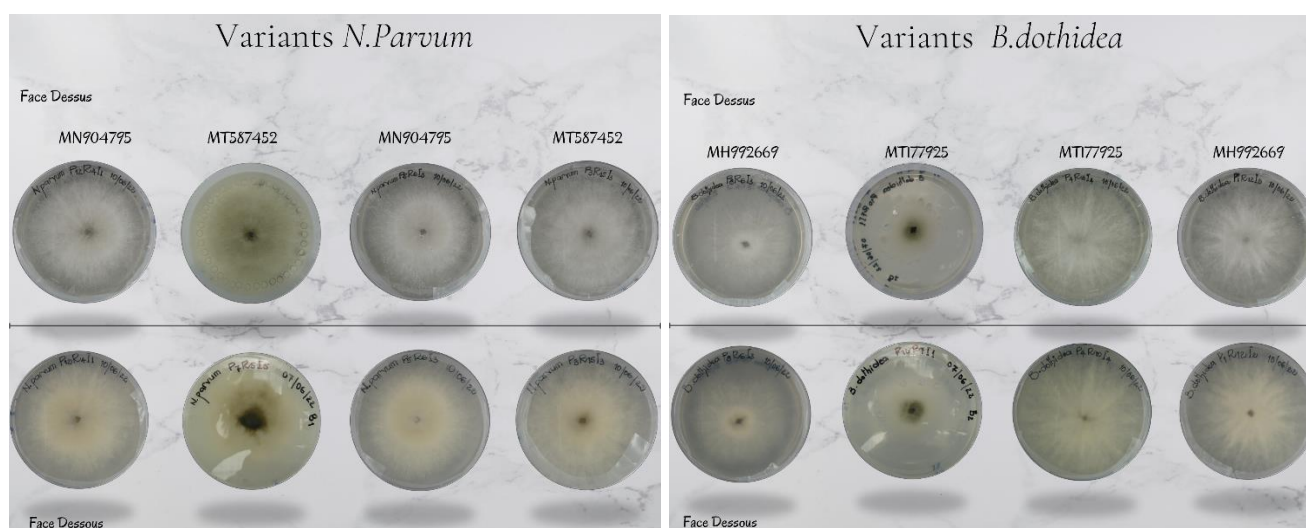


Figure 8 : variants fongiques *N. parvum* et *B. dothidea* des deux espèces ayant servi d'inoculum pour les tests de pathogénicité

3.1.3 Matériels de laboratoire

Quelques outils et matériels ont permis de réaliser les différentes actions de cet essai. Ils sont résumés et illustrés dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 : Matériel de laboratoire et outils utilisés lors de la mise au point du test de pathogénicité








Parafilm®	Scalpel	Boîte de Petri	Spatule	Étiquette	Sécateur	Pied à coulisse
						

Tableau 3 : Description des modalités M1 à M10 en fonction des questions de recherche

Modalités testées	Espèce fongique inoculée	N° du variant ITS	Nbr de Rameaux inoculés	Taille du rameau (mm)	Inoculation	Type de comparaison (différence d'agressivité)	Durée de l'essai
M1	Témoins intactes	-	12		Non		12jours
M2	Témoin blessé	-	12	>7	Non		12 jours
M3	<i>Neofusicoccum parvum</i>	MN904795	12	>7	Oui	Agressivité Intraspécifique	10 jours
M4	<i>Neofusicoccum parvum</i>	MT587452	12	>7	Oui	Agressivité Interspécifique	12 jours
M5	<i>Neofusicoccum parvum</i>	MN904795	12	>7	Oui	Agressivité Intraspécifique	10 jours
M6	<i>Neofusicoccum parvum</i>	MT587452	12	>7	Oui	Agressivité Intraspécifique	10 jours
M7	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	MH992669	12	>7	Oui	Agressivité Intraspécifique	10 jours
M8	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	MT177925	12	>7	Oui	Agressivité Interspécifique	12 jours
M9	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	MT177925	12	>7	Oui	Agressivité Intraspécifique	10 jours
M10	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	MH992669	12	>7	Oui	Agressivité Intraspécifique	10 jours

3.2 Protocole expérimental des tests de pathogénicité réalisés sur plants de noyers en serre

3.2.1 Présentation des modalités : plan expérimental

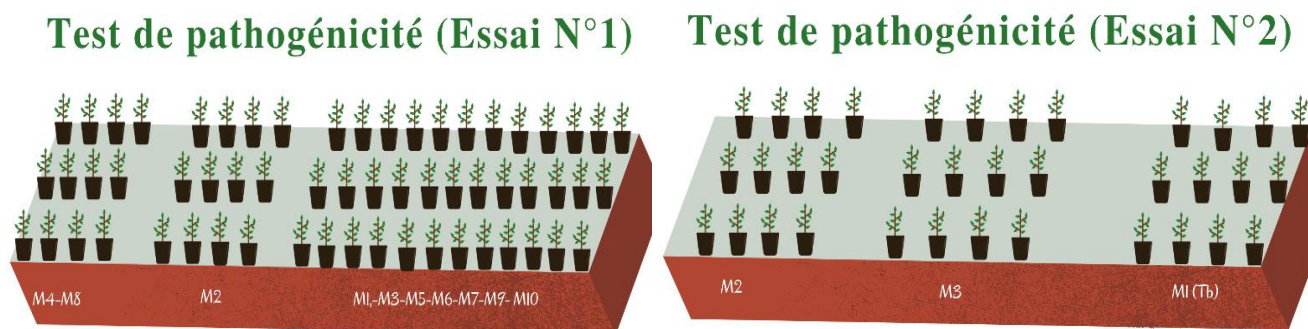


Figure 9 : Plan expérimental des deux essais

Dans cet essai, un plan en blocs randomisés a été utilisé avec les variants fongiques comme variable indépendante. Les rameaux constituent des répétitions biologiques, et les modalités constituent les blocs pour chaque traitement. Au total, 10 modalités ont permis de traiter les trois questions de recherche de cet essai.

- Question de recherche 1 : étude de la pathogénicité des espèces *N. parvum* et *B. dothidea* (modalité M4 et M8 comparaison interspécifique).

Douze plants constitués uniquement de deux rameaux chacun ont servi à traiter la première question de recherche. Ici, il s'agira dans un premier temps de (i) confirmer la pathogénicité des espèces fongiques et de (ii) comparer la différence d'agressivité entre les deux espèces *N. parvum* et *B. dothidea*, (comparaison interspécifique).

- Question de recherche 2 : étude et comparaison de l'agressivité des variants en fonction des espèces (modalité M3 ; M5 ; M6 ; M7 ; M9 ; M10 comparaison intraspécifique).

Ensuite, il sera question de comparer la différence d'agressivité entre les variants d'une même espèce (comparaison intraspécifique). L'agressivité des trois variants appartenant aux espèces *N. parvum* et *B. dothidea* sera évaluée.

N.B Un rameau = une inoculation = une répétition).

- Les modalités témoins

Les modalités témoins, ont été divisées en deux groupes. La modalité M1 témoin, comprend des rameaux n'ayant été ni blessés, ni inoculés : dénommée témoin intacte (TI). La modalité M2 témoin avec blessure (Tb) est constituée de rameaux ayant été blessés et inoculés avec un plug de gélose contenant de l'eau /Agar uniquement.

Ces modalités auront permis de vérifier si les plants de noyer hébergent des espèces des *Botryosphaeriaceae* endophytes.

3.2.2 Méthode d'identification des rameaux

Pour identifier les rameaux susceptibles d'être inoculés, un décompte préalable a été fait. Au total, 120 rameaux ont été choisis sur la base de leur taille (Taille \geq 70 mm).

i. Identification des rameaux pour l'étude de la comparaison interspécifique

Pour les modalités M4 et M8, douze plants ont été sélectionnés pour étudier les différences d'agressivités des deux espèces. Seuls les plants ayant uniquement deux rameaux ont été sélectionnés. Ceci dans le but d'inoculer les variants *Np_V2* (*N. parvum*) et *Bd_V2* (*B. dothidea*) sur deux différents rameaux appartenant à un même plant. Dans cet essai, un rameau correspond à une répétition biologique.

ii. Identification des rameaux pour l'étude de la comparaison intraspécifique

Pour les modalités M3, M5, M6, M7, M9 et M10, trente-six plants ont été sélectionnés pour étudier les différences d'agressivités entre les six variants des deux espèces. Dans ce cas les plants ayant un, deux ou trois rameaux ont été utilisés et une répartition aléatoire des variants en fonction de ces rameaux a été faite. Ceci dans le but d'atteindre les douze répétitions pour chaque modalité. Dans cet essai, un rameau correspond à une répétition biologique.

3.2.3 Préparation de l'inoculum

72 heures avant l'inoculation, les champignons ont été repiqués et incubés à 25 °C à l'obscurité sur un milieu PDA+S. Le jour de l'inoculation, les plugs de mycélium des variants des modalités M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 et M10 ont été préparés à l'emporte-pièce de 4 mm en prenant soin de les

prélever dans la marge de croissance active du champignon. En ce qui concerne les conditions témoins, des plugs de gélose contenant de l'eau-agar de 4 mm de diamètre ont été préparés avec un emporte-pièce stérile directement dans les boîtes de Petri.

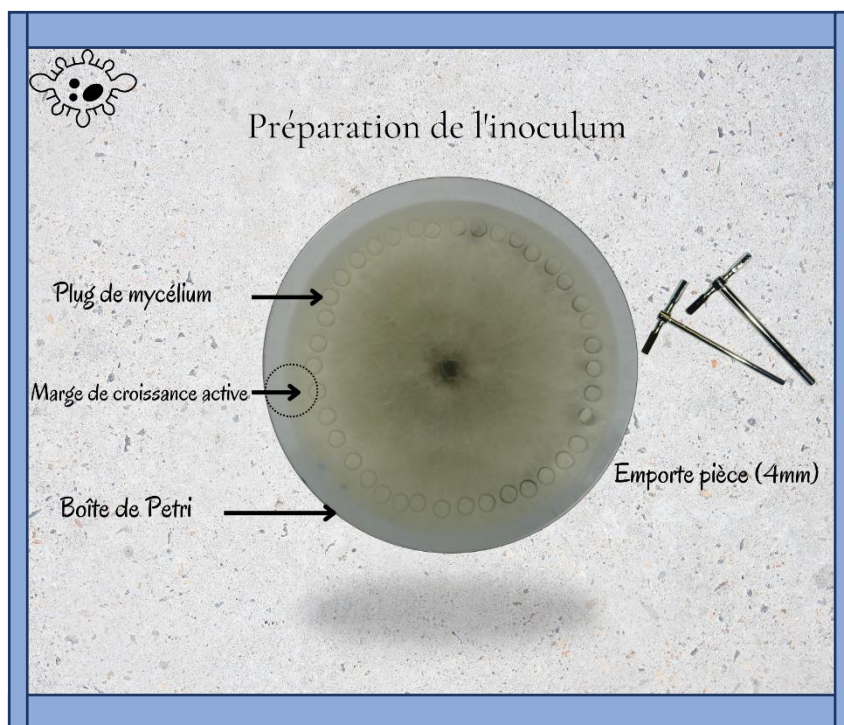


Figure 10 : Préparation de l'inoculum ayant servi au test de pathogénicité

3.2.4 Méthode d'inoculation.

Des rameaux du noyer *Juglans regia* de longueur ≥ 70 mm ont été sélectionnés. La zone d'inoculation située au centre du rameau a été désinfectée en surface par pulvérisation d'une solution d'éthanol à 70 %. L'épiderme du rameau a été retiré à l'aide d'un scalpel stérile. (NB : Une blessure = une lame).

Un plug de mycélium de chaque variant testé a été déposé sur la blessure à l'aide du scalpel stérile. La partie du rameau où l'inoculation a été faite est recouverte du Parafilm® pour éviter le dessèchement de l'inoculum. Au total, 96 rameaux ont été inoculés, et 12 rameaux témoins ont été traités avec plug de gélose constitué d'eau-agar.

La méthode la plus couramment utilisée pour tester la pathogénicité chez les espèces de *Botryosphaeriaceae* consiste à appliquer un bouchon un plug colonisé par le champignon à tester sur une blessure de l'hôte (Brown-Rytlewski and McManus, 2000; Wunderlich *et al.*, 2011).

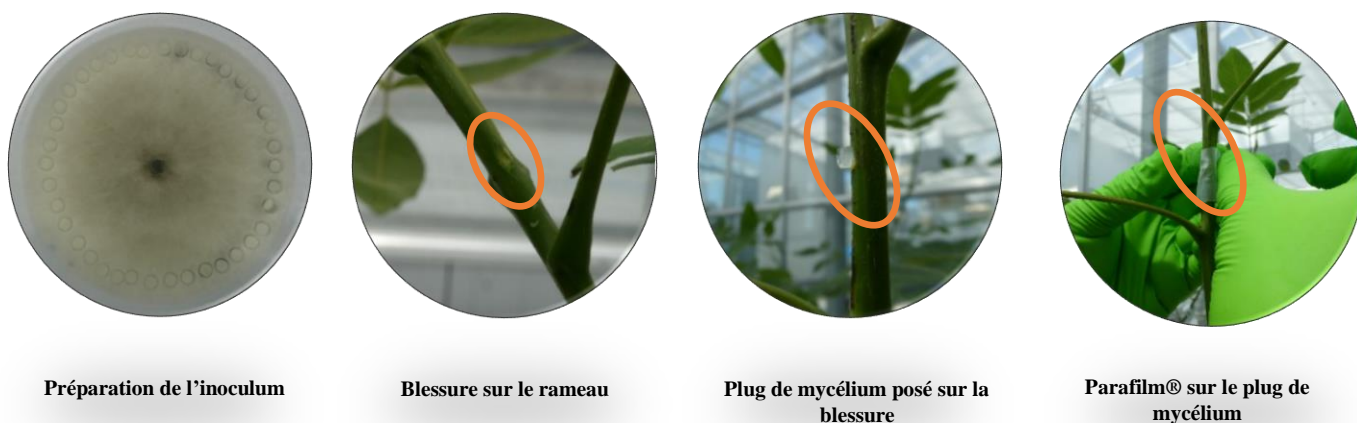


Figure 11 : Étapes d'inoculations

3.2.5 Notations et lecture des résultats des tests

Étape1 : Récolte des rameaux

Douze jours après inoculation, tous les rameaux ont été récoltés par modalités, et ramenés au laboratoire. Des photos de chaque rameau ont été prises et classées par modalités.

Étape2 : Réalisation des mesures

Les mesures des longueurs totales des rameaux ont été prises. Ensuite, le Parafilm® a été retiré, puis les longueurs des nécroses ont été mesurées ex-situ à l'aide du pied à coulisse.

Étape 3 : Section longitudinale des rameaux

Les rameaux ont ensuite été coupés longitudinalement, ceci dans le but de mesurer la longueur interne de la nécrose. Une fois tous les rameaux observés, l'un des postulats de Koch a été appliqué.

Étape 4 : postulat de Koch

Les postulats de Koch énoncés en 1881 par Robert Koch permettent d'établir une relation causale entre une maladie et un agent phytopathogène suspecté d'être pathogène pour les maladies infectieuses des végétaux. Afin de pouvoir établir ce lien, il est d'une importance primordiale valider différentes étapes.

Ces étapes sont :

1. L'agent pathogène doit être présent chez les plantes malades et absent chez les plantes saines.
2. L'agent doit pouvoir être isolé de plantes malades et multiplié en culture pure.
3. Lorsque l'agent pathogène en culture pure est inoculé à une plante saine, il induit des symptômes caractéristiques de maladies.
4. L'agent pathogène initial doit pouvoir être réisolé à partir des plantes infectées expérimentalement.

Les rameaux ont été désinfectés par une solution d'alcool éthylique concentré à 70 %. Ensuite, sous le poste de sécurité microbiologique (PSM) et à l'aide d'un scalpel, les tissus nécrosés ont été prélevés à la frontière entre tissus sains et symptomatiques et mis en culture sur un milieu nutritif (PDA+S).

3.2.6 Analyse des résultats

Les données recueillies ont été traitées avec le logiciel statistique R version 4.1.1. La normalité des données a été vérifiée avec le test Shapiro et l'homogénéité des variances avec le test Bartlett.

Lorsque ces tests de normalité de Shapiro des résidus et d'homogénéité des variances de Bartlett ont été positifs, une anova a été réalisée afin de comparer significativement les différences d'agressivités des variants avec une $P < 0,05$. Au cas échéant, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été effectué suivi des tests de Wilcoxon et de Dunn pour comparer les modalités deux à deux, au seuil $\alpha=0,05$ ($P<0.05$) considéré comme significatif.

3.3 Essai N°2 : Test de pathogénicité sur rameau des jeunes plants de noyer

3.3.1 Objectifs de l'essai N°2

Dans le but de confirmer la pathogénicité des espèces fongiques de la famille des *Botryosphaeriaceae*, et de comparer la différence d'agressivité de *N. parvum* et *B. dothidea*, un second test de pathogénicité a été effectué. Pour se faire, une méthodologie inspirée du premier essai a été utilisée. Cependant, quelques paramètres ont été améliorés. (

i. Identification des rameaux pour l'étude de la comparaison interspécifique (essai 2)

Ici, pour chaque modalité, vingt-quatre plants ont été sélectionnés pour étudier les différences d'agressivités des deux espèces. Seuls les plants ayant au moins un rameau de longueur ± 25 mm ont été sélectionnés. A la différence de l'essai n°1, un plant a été inoculé avec une seule espèce. Dans l'essai n°1, les deux espèces ont été inoculées sur le même plant.

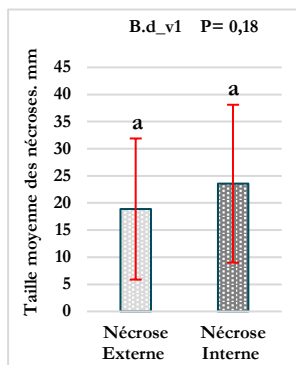
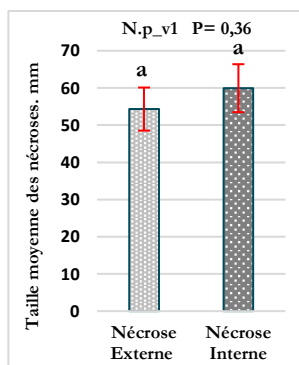
Dans cet essai n°2 les variants (*Np_V2* de *N. parvum* ou *Bd_V2* de *B. dothidea*) ont été de nouveau inoculés mais sur un seul et même plant. Dans cet essai, un plant correspond à une répétition biologique.

NB : un variant = une inoculation = un rameau = un plant.

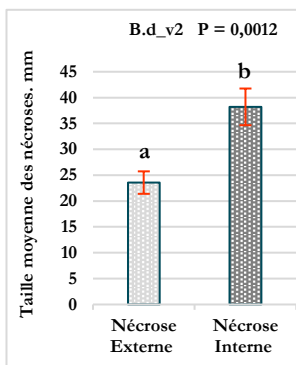
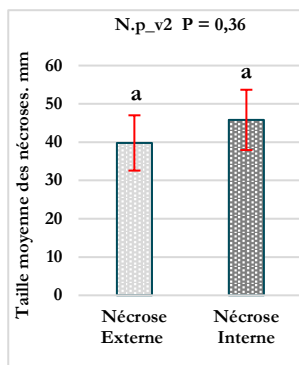
Partie IV : RÉSULTATS

4.1 Étude la pathogénicité des espèces *B. dothidea* et *N. parvum* (comparaison interspécifique)

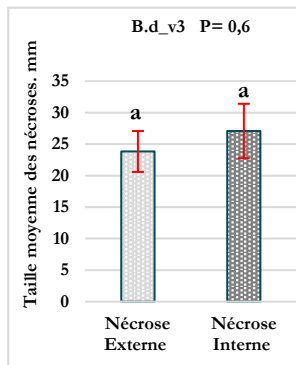
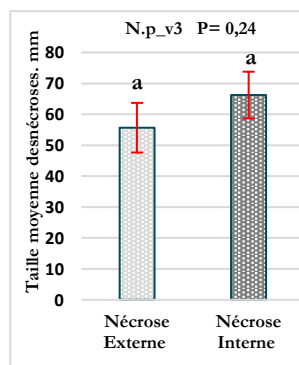
Présentation des résultats sous forme de graphique représentant les longueurs des nécroses internes et externes par modalités : **Kuskal.test**



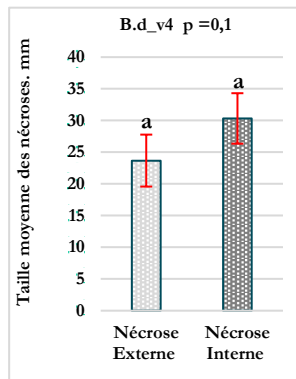
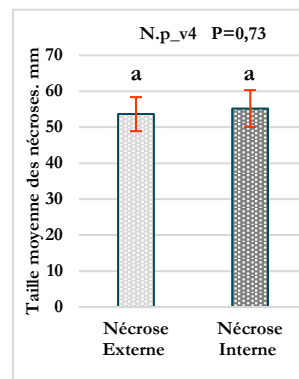
Test de pathogénicité	Modalités	
Variables mesurées	N.p_v1	B.d_v1
Longueur Nécrose Interne (mm)	54,32	18,88
Longueur Nécrose Interne (mm)	59,94	23,56



Test de pathogénicité	Modalités	
Variables mesurées	N.p_v2	B.d_v2
Longueur Nécrose Externe (mm)	39,49	23,57
Longueur Nécrose Interne (mm)	45,81	38,21



Test de pathogénicité	Modalités	
Variables mesurées	N.p_v3	B.d_v3
Longueur Nécrose Externe (mm)	55,66	23,83
Longueur Nécrose Interne (mm)	66,23	27,09



Test de pathogénicité	Modalités	
Variables mesurées	N.p_v4	B.d_v4
Longueur Nécrose Externe (mm)	53,63	23,68
Longueur Nécrose Interne (mm)	55,20	30,33

Figure 12 : Longueur des nécroses internes et externes par modalités

4.1.1 : Description des résultats des modalités M4 : test de pathogénicité de *N. parvum*

a. Nécrose externe

Tous les rameaux de la modalité M4 appartenant à l'espèce *N. parvum* ont tous manifestés des symptômes de nécroses 12 jours après inoculation.

Les résultats présentés en figure 12, révèlent que le variant *Np_V2* (Modalité 4), induit une nécrose externe moyenne de $39,78 \pm 7,21$ mm.

Il ressort de cet essai donc que le variant *Np_V2* testé a été capable d'induire des nécroses sur les tissus superficiels des rameaux des jeunes plants de noyers.

b. Nécrose interne

Les résultats présentés en figure 12, montrent que le variant *Np_V2* (Modalité 4), induit une nécrose moyenne interne de $45,80 \pm 7,87$ mm.

Il ressort de cet essai donc que tous le variant *Np_V2* de la modalité M4 testé n'a seulement pas engendré des décolorations des tissus externes des rameaux, mais aussi a été capable d'induire des nécroses au sein de ces derniers.

4.1.2 : Description des résultats des modalités M8 : test de pathogénicité de *B. dothidea*

a. Nécrose externe

D'après les résultats, tous les rameaux de la modalité M8 sans exception appartenant à l'espèce *B. dothidea* ont tous manifesté des symptômes de nécroses 12 jours après inoculation.

Les résultats présentés en figure 12, révèlent que le variant *Bd_V2* (Modalité 8), induit une nécrose externe moyenne de $23,57 \pm 2,17$ mm. Le variant *Bd_V2* de la modalité M8 testé a été capable d'induire des nécroses des rameaux.

b. Nécrose interne

Les résultats présentés en figure 12, montrent que le variant *Bd_V2* (Modalité 8), a induit une nécrose moyenne interne de $38,21 \pm 3,55$ mm.

le variant *Bd_V2* de la modalité M8 testés a donc causé des lésions nécrotiques dans les tissus internes intérieure de tous les rameaux liés cette modalité.



Figure 13 : **a**- Plant de la modalité témoin blessé ne présentant aucun symptôme de nécrose sur les organes ; **b**- Plants des modalité infectés présentant toutes, les symptômes foliaires et des nécroses sur les rameaux.



Figure 14 : **c**- nécrose causée par les *Botryosphaeriaceae* sur rameau de noyer in planta ; **d**- rameau de noyer du Témoin blessé ne présentant aucun signe de nécrose ; **e**- nécrose externe sur rameau détaché ; **f**- nécrose interne sur rameau détaché ; **g**- Rameau détaché Tb (pas de nécrose) ; **h**- Section longitudinale d'un rameau Tb ne présentant aucun signe de nécrose interne

4.1.3 Comparaison de l'agressivité des espèces *B. dothidea* et *N. parvum*

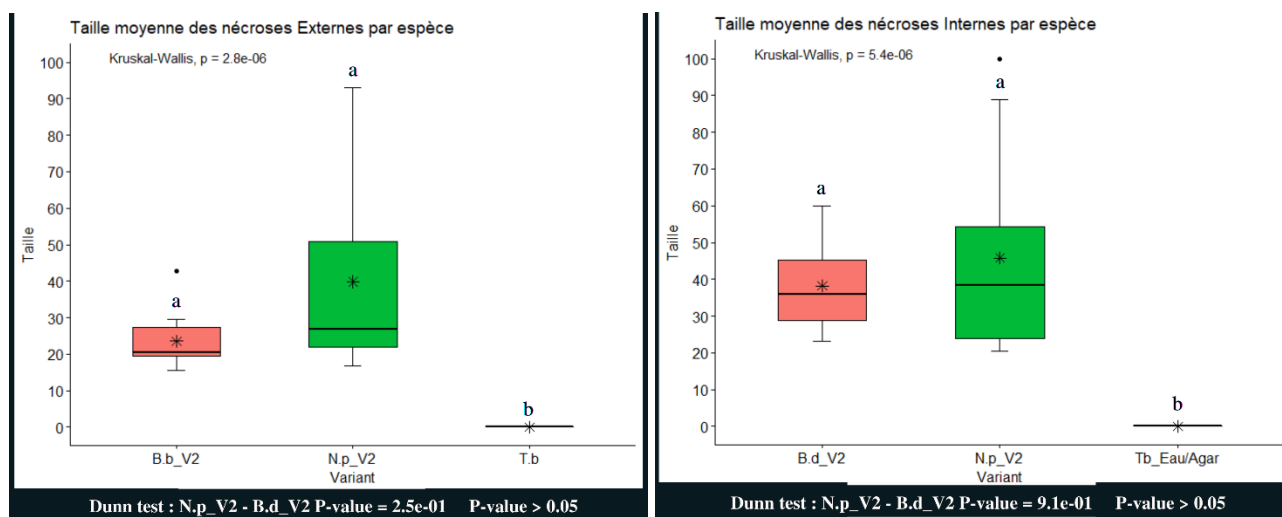


Figure 15 : Taille moyenne des nécrose externe et interne des espèces *N. parvum* et *B. dothidea* (Modalité M2, M4 et M8)

Les deux espèces fongiques mises en évidence à savoir, *N. parvum* et *B. dothidea* ont tous des tailles de nécroses significativement plus longues ($P < 0,05$) que celles des témoins blessés et non blessés qui ne présentaient aucun symptôme nécrotique (Fig. 15). Bien qu'on puisse voir que *N. parvum* a induit des nécroses internes les plus longues ($45,80 \pm 7,87$) mm, les tests statistiques n'ont révélé aucune différence significative d'agressivité entre les deux espèces au seuil $\alpha = 0,05$. Il en est de même pour les nécroses externes.

Afin de limiter l'influence des réactions de défense de la plante, un second test de pathogénicité (essai n°2) a été réalisé. Les résultats sont présentés ci-après.

4.2 : Étude la pathogénicité des espèces *B. dothidea* et *N. parvum* (comparaison interspécifique), essai n°2.

4.2.2 : Description des résultats des modalités M2 : test de pathogénicité de *B. dothidea*

a. Nécrose externe

Tous les rameaux de la modalité M2 ont manifesté des symptômes de nécroses 12 jours après inoculation.

Les résultats présentés en figure 16, révèlent que le variant *Bd_V2* (Modalité 2), a induit une nécrose externe moyenne de $22,20 \pm 1,68$ mm.

Il ressort de cet essai que le variant *Bd_V2* de *B. dothidea* testé a été capable d'induire des nécroses sur les tissus superficiels des rameaux des jeunes plants de noyers.

b. Nécrose interne

Les box-plot présenté en figure 16, révèlent que le variant *Bd_V2* (Modalité 2), a induit des lésions nécrotiques dont la moyenne est de $23,99 \pm 1,78$ mm.

4.2.3 : Description des résultats des modalités M3 : tests de pathogénicité de *N. parvum*

a. Nécrose externe

Les box-plot de la figure 16 montre que le variant *Np_V2* (Modalité 3), a induit une nécrose externe moyenne de $47,97 \pm 3,35$ mm.

Le variant *Np_V2* de *N. parvum* testé a été capable d'induire des nécroses sur les tissus superficiels des rameaux des jeunes plants de noyers.

b. Nécrose interne

Les résultats présentés en figure 1, révèlent que le variant *Np_V2* (Modalité 3), a induit des lésions nécrotiques dont la moyenne est de $50,85 \pm 3,40$ mm.

4.2.4 comparaison interspécifique des espèces *B. dothidea* et *N. parvum*

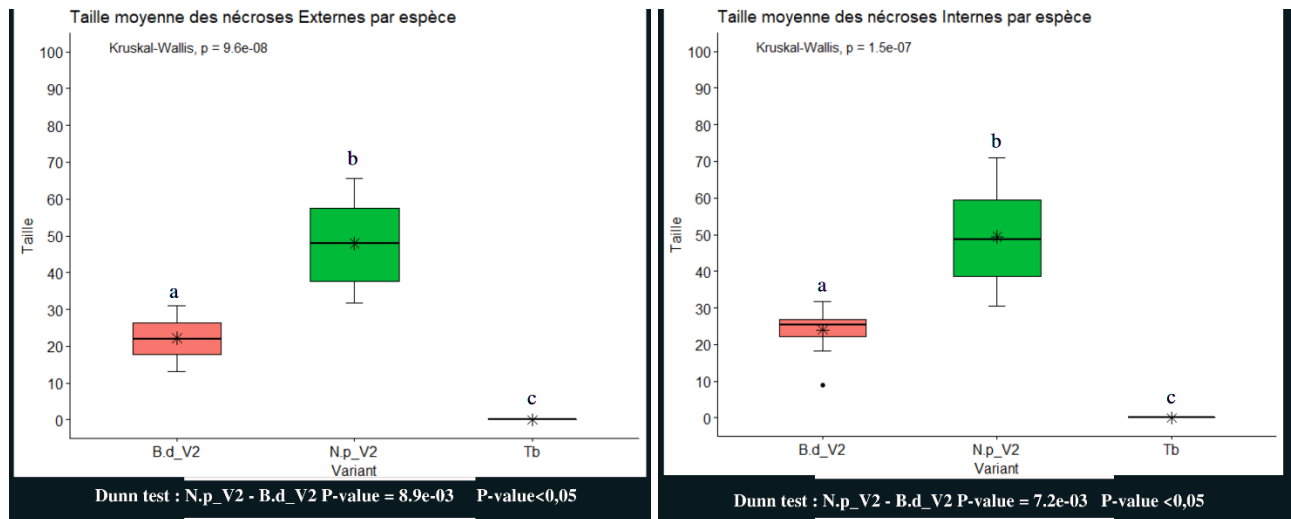


Figure 16 : Taille moyenne des nécrose externe et interne des espèces *N. parvum* et *B. dothidea* (Modalités M1, M2 et M3 (essai 2))

Les espèces *N. parvum* et *B. dothidea* testées ont été capables de provoquer une décoloration des rameaux et des nécroses interne 12 jours après inoculation. Des différences significatives d'agressivité au seuil $\alpha=0,05$ ont été observées entre elles. On note alors une différence de comportement entre les deux espèces mises en évidence. Il ressort de cette analyse que les deux espèces ne présentent pas le même niveau d'agressivité. *N. parvum* a produit des lésions nécrotiques (externes et internes) plus longues que *B. dothidea*

les analyses statistiques confirment également une différence significative entre les longueurs des nécroses induites par *B. dothidea* en comparaison à celle produites par *N. parvum* (comparaison interspécifique).

4.3 Étude la pathogénicité des variants de *B. dothidea* et *N. parvum* (intraspécifique)

Tous les rameaux des modalités M3, M5, M6, M7, M9, M10 ont manifesté des symptômes nécrotiques 10 jours après inoculation à des degrés différents. Il ressort de cet essai donc que tous les variants testés ont été capables d'induire des nécroses des tissus externes et des lésions nécrotiques des tissus internes des rameaux des jeunes plants de noyers dans des conditions environnementales semi-contrôlées. Il est à noter que les lésions restaient localisées au tissu xylémique⁴ qui s'était développé avant l'inoculation (Fig. 16). Quant aux témoins blessés, aucune lésion correspondante à des lésions nécrotiques n'a été observée.

4.3.1 : Description des résultats des modalités M3, M5, M6 (*N. parvum* : (V1, V3 et V4) : comparaison intraspécifique

a. Nécrose externe

⁴ Constituant des tissus végétaux formé de l'association de vaisseaux, de cellules mortes ou vivantes de soutien et de cellules associées.

Les résultats présentés en figure 12, révèlent que les variants *Np_V1* ; *Np_V2* ; *Np_V3* induisent des nécroses externes de longueur moyenne $54,32 \pm 5,79$ mm, $55,66 \pm 8,04$ mm, $53,63 \pm 7,73$ mm respectivement.

Une analyse descriptive de ces trois variants montre que *Np_V2* est le variant le plus agressif. Cependant les tests statistiques de Kruskal-Wallis révèle qu'il n'y a pas de différence statistique entre les variants testés. Les tests de Wilcoxon et de Dunn n'ont décelé aucune différence significative d'agressivité au seuil $\alpha=0,05$ entre les variants de l'espèce *N. parvum*.

b. Nécrose interne

Les résultats présentés en figure 12, révèlent que les variants *Np_V1* ; *Np_V2* ; *Np_V3* induisent des nécroses internes de longueur moyenne $59,94 \pm 6,45$ mm, $66,23 \pm 7,55$ mm, $55,20 \pm 5,12$ mm respectivement.

L'analyse descriptive de ces trois variants montre que *Np_V2* est le variant le plus agressif. Cependant les tests statistiques de Kruskal-Wallis révèlent qu'il n'y a pas de différence statistique entre les variants testés. Cependant les tests de wilcoxon et de Dunn comparant les variants entre eux deux à deux ne montre aucune différence significative d'agressivité au seuil $\alpha=0,05$.

4.3.2 : Description des résultats des modalités M7, M9, M10 *B. dothidea* : V1, V3 et V4 : comparaison intraspécifique

a. Nécrose externe

En ce qui concerne l'espèce *B. dothidea*, la figure 12, montrent que les variants *Bd_V1* ; *Bd_V2* ; *Bd_V3* induisent respectivement des nécroses externes de longueur moyenne $18,88 \pm 13,01$ mm, $23,83 \pm 3,26$ mm, $23,68 \pm 4,10$ mm.

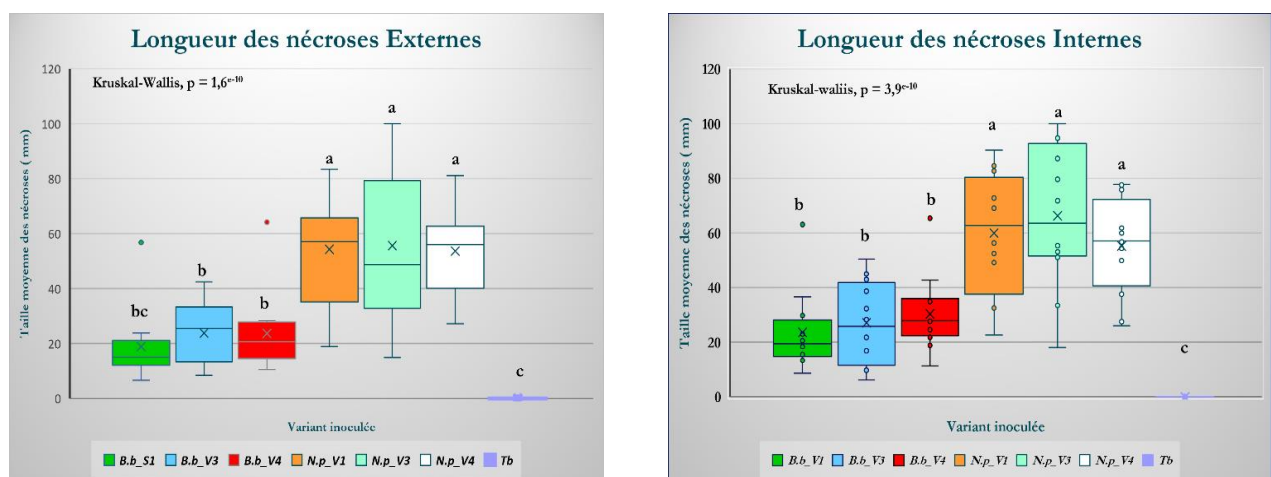
L'analyse descriptive de la figure 12 montre que les trois induisent presque les mêmes tailles de nécroses externes. Ceci a été confirmé par les tests statistiques de Kruskal-Wallis, Wilcoxon et Dunn qui montrent que les trois variants mises en évidences ne sont pas différents statistiquement.

b. Nécrose interne

La figure 12, montre que les variants *Bd_V1* ; *Bd_V2* ; *Bd_V3* induisent des nécroses internes de longueur moyenne $23,56 \pm 14,55$ mm, $27,09 \pm 4,32$ mm, $30,33 \pm 3,98$ mm respectivement. L'analyse descriptive de ces trois variants montrent que *Bd_V3* est visiblement le variant le plus agressif. Cependant les tests statistiques de Kruskal-Wallis révèle qu'il n'y a pas de différence statistique entre les variants testés.

Les tests de Wilcoxon et de Dunn n'ont décelé également aucune différence significative d'agressivité au seuil $\alpha=0,05$ entre les variants de l'espèce *N. parvum*.

4.3.3 Comparaison de l'agressivité des variants *B. dothidea* et *N. parvum* (intraspécifique)



La figure 17 présente deux graphiques (nécrose externe et nécrose interne) de la comparaison intraspécifique. Selon les résultats, les variants *Bd_V1* ; *Bd_V2* ; *Bd_V3* induisent respectivement des nécroses externes de $18,88 \pm 3,76$ mm ; $23,83 \pm 3,26$ mm ; $23,68 \pm 4,1$ mm. et des nécroses internes de $23,56 \pm 4,20$ mm ; $27,09 \pm 4,32$ mm ; $30,33 \pm 3,98$ mm. Quant aux variants *Np_V1* ; *Np_V2* ; *Np_V3*, ils induisent respectivement des nécroses externes de $54,32 \pm 5,79$ mm ; $55,7 \pm 8,0$ mm et $53,6 \pm 4,7$ mm et des nécroses internes de $59,94 \pm 6,45$ mm ; $66,23 \pm 7,55$ mm ; et $50,20 \pm 5,12$ mm.

D'après les tests statistiques de Kruskal-wallis, de Wilcoxon et de Dunn, aucune différence significative n'est observée entre la taille des nécroses engendrées par les variants appartenant à une même espèce.

4.4 Postulat de Koch

Les rameaux de chaque modalité ont été sectionnés en deux et les longueurs des nécroses internes de ces derniers ont été mesurées. Ces derniers ont été désinfectés avec de l'alcool éthylique à 70 %. Puis de petits morceaux de 2 à 4 mm de tissu nécrotique coupés au niveau de la marge de croissance active de la lésion ont été prélevés.

La capacité d'infection de chaque variant a été vérifiée en réisolant les espèces inoculées. Ces morceaux de 3 à 6 mm environ ont été coupés et placés sur un milieu nutritif PDAS dans des boîtes de Petri conservées à environ 25 °C et contrôlées quotidiennement. Tous les champignons inoculés ont été réisolés avec succès à partir de chaque rameau.

N. parvum et *B. dothidea* ont été les champignons les plus régulièrement réisolés, avec une fréquence d'isolement allant de 83,3 à 100 %. Les fréquences d'isolement varient d'une modalité à une autre. Aucune autre espèce de la famille des *Botryosphaeriaceae* n'a été isolée à part *N. parvum* et *B. dothidea*. Cependant d'autres espèces de champignons n'appartenant pas à la famille des *Botryosphaeriaceae* comme *Alternaria spp*, *Cladosporium spp*, *Penicillium spp*, ont également été isolés principalement sur les témoins à de différentes fréquences. (Tableau 4).

B. dothidea a été réisolé à une faible fréquence (1%) dans les témoins intacts. Aucune espèce de *Botryosphaeriaceae* n'a été isolée à partir d'un quelconque tissu des témoins blessés.

Le tableau ci-dessous donne les fréquences d'isolement des espèces fongiques isolées.

Tableau 4 : Fréquences d'isolement des espèces fongiques

Espèces	Variants	Modalités	Test de pathogénicité		
			Fréquence d'infections %	Nombre d'isollements	Fréquence d'isolement %
<i>N. parvum</i>	MN904795	M3	100	24	95,8
<i>N. parvum</i>	MT587452	M4	100	24	83,3
<i>N. parvum</i>	MN904795	M5	100	24	95,8
<i>N. parvum</i>	MT587452	M6	100	24	87,6
<i>B. dothidea</i>	MH992669	M7	100	24	100
<i>B. dothidea</i>	MT177925	M8	100	24	91,6
<i>B. dothidea</i>	MT177925	M9	100	24	87,5
<i>B. dothidea</i>	MH992669	M10	100	24	83,3
Total			100	196	90,55

Les champignons émergents dans les boîtes de Petri ont été identifiés sur la base des caractéristiques morphologiques et de leur vitesse de croissance.

L'analyse du tableau ci-dessus révèle que *B. dothidea* est l'espèce la plus fréquente. Elle a été isolée avec une fréquence de 92%. La fréquence d'isolement cumulés des variants de *N. parvum* est égale à 90,62%.



Figure 18 : Champignons réisolés à partir de la nécrose des rameaux des plants de noyer

Partie V : DISCUSSION

5.1 Confirmation de la pathogénicité de *B. dothidea* et *N. parvum*

Cette étude confirme par un test de pathogénicité le pouvoir pathogène des espèces fongiques de la famille des *Botryosphaeriaceae* sur des jeunes plants de noyers. Il ressort des essais que l'ensemble des variants testés ont tous causés des nécroses externes et internes sur les rameaux. Les nécroses induites par *N. parvum* et *B. dothidea* ont été observées 12 jours après inoculation. Les symptômes correspondaient aux descriptions faites par Chen *et al.*, en (2014). Ils se caractérisent par une décoloration et un brunissement qui apparaît initialement à partir du point d'inoculation, suivi d'un flétrissement des rameaux et la fanaison des feuilles. Ces résultats viennent confirmer que *N. parvum* et *B. dothidea* sont des espèces susceptibles d'engendrer des symptômes de dépérissement du noyer dans les conditions propices à leur développement. Ces deux espèces ont été signalées précédemment pour causer le dépérissement du noyer dans le monde entier (Chen *et al.*, 2014; Michailides *et al.*, 2017; Gusella *et al.*, 2020).

5.2 Différence observée entre les nécroses externes et internes

L'analyse descriptive des nécroses observées lors des coupes longitudinales des rameaux infectées des modalités M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 et M10 ont montré que les tailles des nécrose interne étaient plus grande que les nécroses externes. Cependant, aucune différence significative n'est observée entre les longueurs externes et internes de la quasi-totalité des modalités. Seul la modalité M8 (*B.d_V2*) montrent une différence significative au seuil ($P < 0,05$) entre les variables mesurés (longueur externe et longueur interne). Dans la plupart des cas, les nécroses internes observées à l'intérieur des rameaux s'accompagnaient des lésions des tissus moelleux du rameaux, entraînant une pourriture complète de ce dernier. Ceci pourrait être dû au fait que les *Botryosphaeriaceae* ont tendance à vite coloniser les tissus internes des organes infectés. D'une autre part, la pression exercée par l'inoculum sur la blessure pourrait être l'origine.

Et si le plug de mycélium était posé sur le rameau sans blessure ?

Cette question, dans un futur proche, pourrait être résolu par un essai, où il sera question d'évaluer la vitesse de colonisation des champignons dans différent tissus des rameaux.

5.3 Différence d'agressivité entre les espèces *B. dothidea* et *N. parvum*

Il semble que les changements dans les facteurs environnementaux aient un effet important sur le développement de la maladie et cela peut être dû à une rupture des défenses de la plante contre l'agent pathogène. Bien que les deux espèces de champignons aient causé des nécroses sur les rameaux, les tests statistiques n'ont décelé aucune différence d'agressivité significative dans l'essai de pathogénicité n°1. Ces résultats ont suscité la formulation de quelques hypothèses, d'où la mise en place d'un second essai.

- La plante aurait activé ses réactions de défenses après l'inoculation, ce qui aurait ralenti l'expression de l'une des espèces fongiques inoculées.
- Les conditions de température ont été beaucoup plus été bénéfiques ou moins bénéfique pour *N. parvum* ou *B. dothidea*.
- L'uniformité de la longueur des rameaux aurait joué un rôle dans la vitesse de croissance des nécroses engendrées par les deux espèces.

Pour trouver des réponses à ces questions pertinentes, un second essai a eu lieu.

Dans cet essai (test de pathogénicité n°2) les variabilités possibles ont été minimisées. Le test a révélé que toutes les deux espèces sont pathogènes sur leur hôte. L'espèce *N. parvum* était le

champignon le plus agressif et l'espèce *B. dothidea* était le moins agressif. Une différence significative d'agressivité entre les deux espèces a été observée en fonction du tissu infecté interne et externe. Il est à noter que dans cet essai, tous les rameaux ont pratiquement les mêmes longueurs, et chaque espèce a été inoculée sur un seul plant (ce qui n'a pas été le cas dans le précédent essai).

Les observations de cet essai ont permis de distinguer une différence d'agressivité entre les espèces. *N. parvum* présente un comportement plus agressif que *B. dothidea*, à en juger par la précocité et l'intensité des symptômes. Ce résultat est cohérent avec ceux obtenus par Phillips en (2002) et Dewasme *et al.*, (2009), qui ont rapporté des symptômes plus sévères de *N. parvum*. D'autres études de pathogénicité comparatives des champignons de la famille des *Botryosphaeriaceae*, utilisant plusieurs espèces, ont également montré que *N. parvum* produisait des lésions plus longues que *B. dothidea*, qui était moyennement virulents sur les plants de noyer testés. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux obtenus par Chen *et al.*, en (2014) en Californie, où *N. parvum* était l'espèce la plus agressive pour le noyer.

Il est à noter également que la plupart des lésions nécrotiques engendrées par *N. parvum* ont très vite provoqué la pourriture du rameau au site d'inoculation, et ont provoqué des symptômes foliaires sur la quasi-totalité des plantes de la modalité M3 du second essai.

5.3. Différence d'agressivité entre les variants de *B. dothidea* et *N. parvum*

La différence d'agressivité des variants est évaluée selon la taille moyenne de la nécrose interne des rameaux sur lesquelles il provoque des lésions nécrotiques. Même si de légères différences de moyenne ont été observées entre tous les variants des deux espèces, ces derniers ne présentent pas de différences significatives entre eux selon les tests statistiques de Kruskal-Wallis, Dunn et de Wilcoxon. Les variants appartenant à la même espèce étudiée présentaient le même niveau de fitness et d'agressivité, quel que soit le bassin dans lequel ce variant a été isolé.

D'autres part, les indicateurs mesurés, longueur des rameaux, longueur des nécroses interne et externes n'ont pas permis d'expliquer des différences d'agressivité entre les variant mises en évidence. Nous avons quand même vu dans l'essai que des tendances se démarquaient entre ces variants. Il serait de ce fait, intéressant de reconduire ces modalités sur un essai avec un plus grand nombre de plants et de rameaux sur une longue durée pour lever le doute sur des questions d'agressivité entre les différents variants au sein d'une même espèce.

5.4 Confirmation de la relation de cause à effet

Les postulats de Koch révèlent que les nécroses étaient induites par les espèces fongiques utilisées dans cet essai, ce qui a permis de valider la relation de cause à effet existant entre variants utilisés et leur hôte. La cohérence des réisolements des deux espèces de champignons était en accord avec les infections de chaque variant observé dans les tests de pathogénicité. Il est à noter également que *N. parvum* possède une vitesse de croissance plus importante que *B. dothidea*. Cette différence est observable sur les rameaux après inoculation et dans les boîtes de Petri lorsque ces dernières ont été réisolées. Les contaminations observées dans les boîtes témoins sont moins importantes. La présence des contaminations n'a causé aucune nécrose externe ni interne sur les rameaux.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

De cette étude, nous retenons ceci : les espèces fongiques *B. dothidea* et *N. parvum* mises en évidence, ont manifesté leur virulence vis-à-vis des plants de noyers sur lesquels elles ont été inoculées. Ils provoquent des nécroses externes et internes liées à la dégradation des tissus vasculaires et du tissu moelleux des rameaux. *B. dothidea* et *N. parvum* sont donc pathogènes sur noyer.

Cela confirme les études selon lesquelles les *Botryosphaeriaceae* sont associés au phénomène de dépérissement du noyer. Les résultats de ce projet s'ajoutent aux nombreuses études des *Botryosphaeriaceae* ayant révélé un réel intérêt dans la gestion durable des maladies fongiques liées au dépérissement du noyer. Jusque-là, il est impossible de se prononcer sur la maîtrise des *Botryosphaeriaceae*. D'importantes investigations, enquêtes, et études plus approfondies sur la diversité et la biologie de ces pathogènes seront nécessaires pour élucider le complexe des *Botryosphaeriaceae* et ainsi mieux comprendre leur épidémiologie. Cela permettrait de mieux appréhender les complexes fongiques et d'étudier les facteurs déclenchants de la maladie (pratiques culturales, facteurs pédo-climatiques).

L'essai mené a ainsi fourni des informations supplémentaires dans la compréhension des phénomènes de dépérissement dans les noyeraies françaises.

Il sera primordial de poursuivre les essais dont :

- Les suivis épidémiologiques sur plusieurs saisons en vergers de noyer.
- L'exploration de la piste des complexes fongiques dans la compréhension des phénomènes de dépérissement.
- L'étude des facteurs déclenchants de la pathogénicité des *Botryosphaeriaceae*.

Enfin, les résultats obtenus dans le cadre de ce stage sont cohérents avec ceux observés en verger sous l'influence des paramètres environnementaux et pédo-climatiques.

Bibliographie

- Ambroise-Thomas, S. (1998) 'La mélatonine : rôle biologique, intérêt et limites de l'usage thérapeutique', p. 132.
- ANSES (no date) *Tables nutritionnels noix, séchée, cerneaux*. Available at: <https://ciqual.anses.fr/> (Accessed: 11 January 2021).
- Baskarathevan, J. *et al.* (2012) 'Genetic and pathogenic diversity of *Neofusicoccum parvum* in New Zealand vineyards', *Fungal Biology*, 116(2), pp. 276–288. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.11.010>.
- Brown-Rytlewski, D. and McManus, P. (2000) 'Virulence of *Botryosphaeria dothidea* and *Botryosphaeria obtusa* on Apple and Management of Stem Cankers with Fungicides', *Plant Disease - PLANT DIS*, 84, pp. 1031–1037. Available at : <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.9.1031>.
- Choueiri, E. *et al.* (2014) 'Fungal community associated with grapevine wood lesions in Lebanon', *OENO One*, 48(4), pp. 293–302. Available at : <https://doi.org/10.20870/oenone.2014.48.4.1696>.
- Chen, S. *et al.* (2014) 'Phylogeny, Morphology, Distribution, and Pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthaceae* from English Walnut in California', *Plant Disease*, 98(5), pp. 636–652. Available at : <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0706-RE>.
- De Souza, R.G.M. *et al.* (2017) 'Nuts and Human Health Outcomes: A Systematic Review', *Nutrients*, 9(12), p. 1311. Available at : <https://doi.org/10.3390/nu9121311>.
- Dewasme, C. *et al.* (2009) 'Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France', *Phytopathologia Mediterranea*, 48, pp. 32–46. Available at : https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-2873.
- Gallais, A. and Bannerot, H. (1992) *Amélioration des espèces végétales cultivées. Objectifs et critères de sélection*. Editions Quae.
- Garavel, L. (1959) *culture du noyer*. Baillière. Available at: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=culture+du+noyer&author=Garavel%2C+Louis.&publication_year=1959 (Accessed: 27 August 2022).
- Germain, E., Jalinat, J., & Marchou, M. (1975) *Divers aspects de la biologie florale du noyer*.
- Gusella, G. *et al.* (2020) '*Botryosphaeriaceae* species causing canker and dieback of English walnut (*Juglans regia*) in Italy', *Forest Pathology* [Preprint]. Available at : <https://doi.org/10.1111/efp.12661>.
- Interfel, FranceAgriMer and ministère de l'Agriculture et de l'alimentation (no date) *Carte d'identité et information divers sur la noix*. Available at: <https://www.lesfruitsetlegumesfrais.com/fruits-legumes/fruits-a-coque/noix/carte-identite#content> (Accessed: 11 January 2021).
- Kuntzmann, P., Villaume, S. and Bertsch, C. (2009) 'Conidia dispersal of *Diplodia* species in a French vineyard', *Phytopathologia Mediterranea*, 48(1), pp. 150–154.
- Li, G. *et al.* (2016) 'Characterization of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia pseudotheobromae* from English Walnut in China', *Journal of Phytopathology*, 164(5), pp. 348–353. Available at : <https://doi.org/10.1111/jph.12422>.
- López-Moral, A. *et al.* (2020) 'Etiology of Branch Dieback and Shoot Blight of English Walnut Caused by *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthe* Species in Southern Spain', *Plant Disease*, 104(2), pp. 533–550. Available at: <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0545-RE>.
- Lot, C. d'agriculture du (2020) *Noix*. Available at: <https://lot.chambre-agriculture.fr/productions-techniques/cultures/arboriculture/noix/> (Accessed: 16 May 2022).
- Marsberg, A. *et al.* (2017) '*Botryosphaeria dothidea*: a latent pathogen of global importance to woody plant health', *Molecular Plant Pathology*, 18(4), pp. 477–488. Available at: <https://doi.org/10.1111/mp.12495>.

- Michailides, T.J. *et al.* (2017) ‘*Botryosphaeria* and *Phomopsis* Canker Management in California Walnut Orchards’. Available at: <https://www.walnut.net.au/wp-content/uploads/2017/12/Botryosphaeria-and-Phomopsis-Presentation-Themis-Michailides-Walnut-Farm-Walk-Nov2017.pdf> (Accessed: 13 January 2021).
- Moral, J. *et al.* (2019) ‘Ecology and Epidemiology of Diseases of Nut Crops and Olives Caused by *Botryosphaeriaceae* Fungi in California and Spain’, *Plant Disease*, 103(8), pp. 1809–1827. Available at: <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0622-FE>.
- van Niekerk, J.M. *et al.* (2004) ‘DNA Phylogeny, Morphology and Pathogenicity of *Botryosphaeria* Species on Grapevines’, *Mycologia*, 96(4), p. 781. Available at: <https://doi.org/10.2307/3762112>.
- Phillips, A.J.L. (2002) ‘*Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal’, *Phytopathologia Mediterranea*, 41(1), pp. 3–18. Available at: https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1655.
- Phillips, A.J.L. *et al.* (2013) ‘The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture’, *Studies in Mycology*, 76, pp. 51–167. Available at: <https://doi.org/10.3114/sim0021>.
- Pusey *et al.* (2015) Characterization and Pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* Species Isolated from Almond Trees on the Island of Mallorca (Spain). Available at : <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0676-RE>.
- Sivanesan, A. (1984) ‘The bitunicate Ascomycetes and their anamorphs.’
- Slippers, B. *et al.* (2004) ‘Combined Multiple Gene Genealogies and Phenotypic Characters Differentiate Several Species Previously Identified as *Botryosphaeria dothidea*’, *Mycologia*, 96(1), p. 83. Available at: <https://doi.org/10.2307/3761991>.
- Slippers, B. *et al.* (2017) ‘Diversity in the *Botryosphaeriales* : Looking back, looking forward’, *Fungal Biology*, 121(4), pp. 307–321. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.02.002>.
- Slippers, B. and Wingfield, M.J. (2007) ‘*Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact’, *Fungal Biology Reviews*, 21(2–3), pp. 90–106. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>.
- Sorrenti, G. (2019) ‘Nocicoltura da frutto: Innovazione e Sostenibilità. Atti delle Giornate tecniche nazionali SOI NOCE 2019’. Available at : <https://doi.org/10.6092/UNIBO/AMSACTA/6228>.
- Valencia, D. *et al.* (2015) ‘Dissemination of *Botryosphaeriaceae* conidia in vineyards in the semiarid Mediterranean climate of the Valparaíso Region of Chile’, *Phytopathologia Mediterranea*, 54(2), pp. 394–402.
- Wunderlich, N. *et al.* (2011) ‘Refining the biological factors affecting virulence of *Botryosphaeriaceae* on grapevines’, *Annals of Applied Biology*, 159(3), pp. 467–477. Available at : <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2011.00508.x>.

Webographie

[Voici les chiffres à retenir sur la production mondiale de noix \(landini.it\)](#)

<http://lamaisonchante.com/2019/09/le-noyer-la-noix-dans-tous-ses-etats/>

[Interfel, FranceAgriMer and ministère de l’Agriculture et de l’alimentation \(no date\) Carte d’identité et information divers sur la noix. Available at: <https://www.lesfruitsetlegumesfrais.com/fruits-legumes/fruits-a-coque/noix/carte-identite#content> \(Accessed: 11 January 2021\).](#)

Annexe

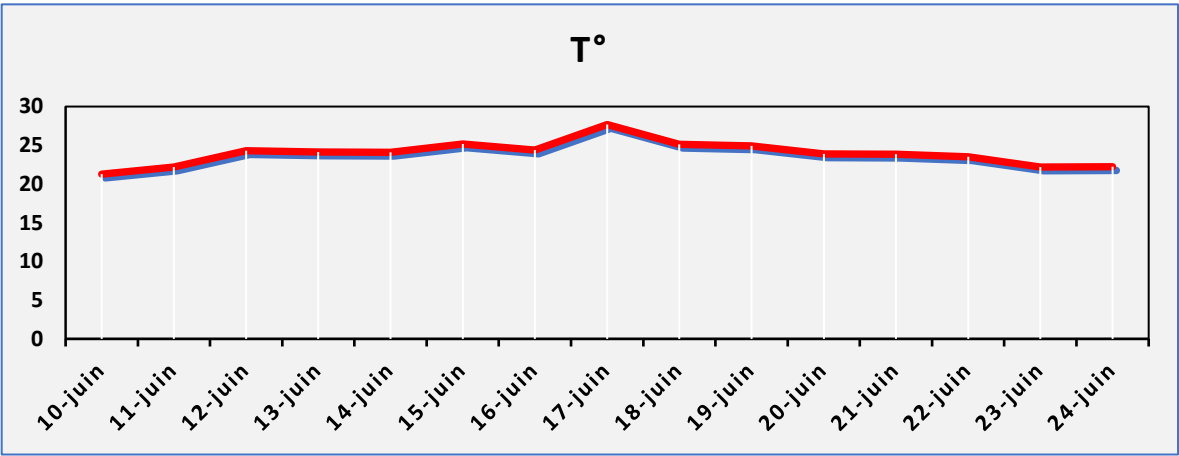


Figure 19 : courbe des températures moyennes quotidiennes recueillies au cours de l'essai

Tableau 5 : Longueur externe et interne moyenne des nécroses en fonction des variants et modalités des deux essais

Localisation variant	Espèces	Origine	Variant ITS	Nbre de rameaux inoculés	Modalité	Longueur moyenne des NE (mm)	Longueur moyenne des NI
Test de pathogénicité 1							
Témoin (intact)	Rien	-	-	-	M1	0	0
Témoin (blessure)	Eau-agar	-	-	12	M2	0	0
SUD-OUEST	<i>N. parvum</i>	P12R4I1	MN904795	12	M3	54,32	59,94
SUD-OUEST	<i>N. parvum</i>	P7R5I5	MT587452	12	M4	39,78	45,80
SUD-EST	<i>N. parvum</i>	P5R6I3	MN904795	12	M5	55,66	66,23
SUD-EST	<i>N. parvum</i>	P3R15I3	MT587452	12	M6	53,63	55,20
SUD-OUEST	<i>B. dothidea</i>	P8R6I3	MH992669	12	M7	18,88	23,56
SUD-OUEST	<i>B. dothidea</i>	P10R7I1	MT177925	12	M8	23,57	38,21
SUD-EST	<i>B. dothidea</i>	P4R10I4	MT177925	12	M9	23,83	27,09
SUD-EST	<i>B. dothidea</i>	P1R12I2	MH992669	12	M10	23,68	30,33
Test de pathogénicité 2							
Témoin (blessure)	Eau-agar	-	-	12	M1	0	0
SUD-OUEST	<i>N. parvum</i>	P7R5I5	MT587452	12	M2	22,20	23,99
SUD-OUEST	<i>B. dothidea</i>	P10R7I1	MT177925	12	M3	47,97	50,85



Figure 20 : **a**- conidies observés sur rameau nécrosé. **b**- Foliole nécrosée