

Etude du mode de conservation hivernal chez l'oïdium des chênes



Mémoire de fin d'études

Crédits photographiques : UMR BIOGECO – INRA Bordeaux - Aquitaine

AgroParisTech – ENGREF
FORMATION DES INGENIEURS FORESTIERS

–
Institut national de la recherche agronomique Bordeaux – Aquitaine
UMR Biodiversité, gènes et communauté

Etude du mode de conservation hivernal chez l'oïdium des chênes

Mémoire de fin d'études

FICHE SIGNALÉTIQUE D'UN TRAVAIL D'ÉLÈVE DE LA FIF

Formation des ingénieurs forestiers de l'ENGREF Agro Paris Tech	TRAVAUX D'ÉLÈVES
TITRE : Etude du mode de conservation hivernal chez l'oïdium des chênes	Mots clés : <i>Oïdium des chênes,</i> <i>Erysiphe spp.,</i> <i>Survie hivernale,</i> <i>Pousses drapeaux,</i> <i>Nested PCR.</i>
AUTEUR : Thomas SCORDIA	Promotion : 18 ^{ème} Promotion
Caractéristiques : 1 volume ; 62 pages ; 20 figures ; 15 tableaux ; 8 annexes ; bibliographie	

CADRE DU TRAVAIL

ORGANISME PILOTE OU CONTRACTANT : UMR BIOGECO – Institut national de la recherche agronomique Bordeaux - Aquitaine		
Nom du responsable : Nicolas FEAU Fonction : post-doctorant		
Nom du correspondant ENGREF : Louis-Michel NAGELEISEN		
Tronc commun <input type="checkbox"/> Option <input type="checkbox"/> D. d'approfondissement <input checked="" type="checkbox"/>	Stage en entreprise <input type="checkbox"/> Stage à l'étranger <input type="checkbox"/> Stage fin d'études <input checked="" type="checkbox"/> Date de remise : 26 août 2010	Autre <input type="checkbox"/>
Contrat avec Gref Services Nancy <input type="checkbox"/> OUI <input checked="" type="checkbox"/> NON		

SUITE À DONNER (réservé au service des études)

- Consultable et diffusable
- Confidentiel de façon permanente
- Confidentiel jusqu'au / / , puis diffusable

Résumé

La saison épidémique de l'oïdium des chênes débute avec le développement de pousses drapeaux au début du printemps. Les pousses drapeaux sont exclusivement liées à l'espèce *Erysiphe quercicola*, tandis que *E. alphitoides* est principalement responsable de symptômes communs ayant lieu pendant le reste de la saison de croissance. La mise en place de deux expériences complémentaires (débourrement en milieu contrôlé et détection d'ADN d'oïdium dans des bourgeons en dormance en utilisant une méthode de diagnostic moléculaire) nous a permis i. de confirmer l'hypothèse d'hivernation de l'oïdium dans les bourgeons de chênes et ii. étonnamment, de détecter les deux espèces, *E. quercicola* mais aussi *E. alphitoides* dans les bourgeons en dormance.

Mots-clés : Oïdium des chênes / *Erysiphe* spp. / Survie hivernale / Pousses drapeaux / *Nested PCR*

Abstract

Epidemic season of oak powdery mildew starts with development of flag shoot symptom in early spring. Flag shoot has exclusively been linked to the *Erysiphe quercicola* species, whereas *E. alphitoides* is mainly responsible of common symptoms occurring during the rest of the growing season. The implementation of two complementary experiments (bud break under controlled conditions and detection of powdery mildew DNA in dormant buds using a molecular diagnostic method) allowed us i. to confirm the hypothesis of overwintering of powdery mildew in oak buds and ii. surprisingly, to detect both species, *E. quercicola* and but also *E. alphitoides* in dormant buds

Keywords : Oak powdery mildew / *Erysiphe* spp. / Overwintering / Flag shoots / *Nested PCR*

Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier Dominique PIOU, ingénieur responsable de l'antenne spécialisée du DSF à l'INRA de Bordeaux sans qui je n'aurais jamais pu avoir ce stage.

Je tiens ensuite à remercier Antoine KREMER, directeur de l'UMR BIOGECO de l'INRA qui m'a accueilli au sein de son unité en tant que stagiaire ainsi que Cécile ROBIN, directrice du laboratoire de pathologie forestière de l'UMR BIOGECO au sein duquel j'ai effectué mon stage de fin d'études.

Je remercie sincèrement mon maître de stage, Nicolas FÉAU, post-doctorant à l'UMR BIOGECO, qui m'aura consacré beaucoup de temps et d'énergie au cours de ces six mois de stage et tout particulièrement à la rédaction de mon mémoire de fin d'études.

Un grand merci à Thierry HARDY et Mickaël RICORDEL, correspondants-observateurs du DSF, qui m'ont accordé un peu de leur précieux temps pour réaliser des prélèvements d'échantillons essentiels à mon étude.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement Xavier CAPDEVIELLE, technicien de recherche à l'UMR BIOGECO pour m'avoir supporté pendant deux jours, pour réaliser des prélèvements sur le terrain.

Un grand merci à toutes les personnes de l'UMR qui m'ont accompagné durant ces six mois notamment : Marie-Laure DESPREZ-LOUSTAU, la petite sorcière bien aimée du laboratoire Martine MARTIN ainsi que Isabelle et François et leur aide précieuse au laboratoire.

Merci à tous les stagiaires sans qui l'ambiance n'aurait pas été la même dans la salle stagiaire, merci à vous Arnaud, Tiphaine, Isabelle et Sophie ainsi que tous les nouveaux arrivants.

Je tiens à remercier Louis-Michel NAGELEISEN, ingénieur responsable de l'antenne spécialisée du DSF à l'INRA de Champenoux, pour avoir accepté de me suivre en tant que correspondant ENGREF.

Un remerciement tout particulier à Nolwenn, mon amie, qui m'a soutenu jusqu'à la fin de mon stage notamment au moment de la rédaction du mémoire.

Mais aussi, un grand merci à ma famille et mes amis qui m'ont soutenu tout au long de ma scolarité et sans qui je n'aurais pas réussi à atteindre ce vieux rêve d'enfant...

Enfin merci à tous ceux que j'aurais pu oublier !

Table des matières

FICHE SIGNALÉTIQUE D'UN TRAVAIL D'ÉLÈVE DE LA FIF.....
RESUME.....
ABSTRACT.....
REMERCIEMENTS.....	1
TABLE DES MATIÈRES	2
TABLE DES FIGURES	4
TABLE DES TABLEAUX	5
INDEX ALPHABÉTIQUE	6
1. INTRODUCTION	7
1.1. QUELQUES BASES D'ÉPIDÉMIOLOGIE.....	7
1.2. LES OÏDIUMS.....	7
1.3. L'OÏDIUM DES CHÊNES	8
1.3.1. <i>Taxonomie de l'oïdium des chênes</i>	9
1.3.2. <i>Historique de la maladie</i>	10
1.3.3. <i>Symptômes et dégâts de la maladie</i>	11
1.3.4. <i>Distribution spatiale de la maladie</i>	12
1.3.5. <i>Cycle biologique</i>	13
1.3.6. <i>Moyens de lutte</i>	16
1.4. PROBLÉMATIQUE.....	16
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	18
2.1. DÉBOURREMENT DE TIGES DE CHÊNES EN MILIEU CONTRÔLE.....	18
2.1.1. <i>Test préliminaire</i>	18
2.1.1.1. Matériel végétal.....	18
2.1.1.2. Mise en place du test.....	18
2.1.1.3. Suivi du test.	19
2.1.2. <i>Expérience débourrement</i>	19
2.1.2.1. Matériel végétal.....	19
2.1.2.2. Mise en place.....	19
2.1.2.3. Suivi de l'expérience	21
2.2. DÉTECTION DE MATÉRIEL FONGIQUE DANS LES BOURGEONS	21
2.2.1. <i>Test préliminaire</i>	21
2.2.1.1. Matériel végétal.....	21
2.2.1.2. Préparation des groupes de bourgeons avant extraction	21
2.2.1.3. Extraction d'ADN d'oïdium à partir des kits Invisorb® et NucleoSpin®	22
2.2.1.4. Amplification de l'ADN par la technique dite de « <i>nested PCR</i> ».....	22
2.2.2. <i>Détection de matériel fongique dans les bourgeons par l'utilisation de la PCR</i>	23
2.2.2.1. Matériel végétal.....	23
2.2.2.2. Préparation préliminaire : découpage des bourgeons	24

2.2.2.3.	Première étape : détection par groupes.....	24
2.2.2.3.1.	Extraction d'ADN à l'aide du Kit NucleoSpin®	24
2.2.2.3.2.	Amplification de l'ADN par nested PCR	24
2.2.2.3.3.	Identification des lignées par digestion enzymatique de l'ADN amplifié	25
2.2.2.3.4.	Séquençage des échantillons positifs	26
2.2.2.3.4.1.	Obtention des séquences	26
2.2.2.3.4.2.	Analyse des séquences	26
2.2.2.4.	Deuxième étape : détection individuelle	26
2.2.3.	<i>Expérience de contrôle sur pousses drapeaux</i>	26
2.2.3.1.	Matériel végétal.....	27
2.2.3.2.	Préparation préliminaire des échantillons.....	27
2.2.3.3.	Extraction d'ADN sur feuilles au CTAB.....	27
2.2.3.4.	Amplification de l'ADN grâce à une PCR spécifique.....	27
2.2.3.5.	Identification des lignées par digestion enzymatique de l'ADN amplifié	27
3.	RESULTATS.....	28
3.1.	DEBOURREMENT DE TIGES DE CHENES EN MILIEU CONTROLE.....	28
3.1.1.	<i>Test préliminaire</i>	28
3.1.2.	<i>Expérience sur le débourrement</i>	29
3.2.	EXPERIENCE SUR LA DETECTION DE MATERIEL FONGIQUE DANS LES BOURGEONS	30
3.2.1.	<i>Test préliminaire</i>	30
3.2.2.	<i>Détection de matériel fongique dans les bourgeons par l'utilisation de la nested PCR</i>	32
3.2.2.1.	Détection par groupes de bourgeons	32
3.2.2.2.	Détection individuelle.....	35
3.2.3.	<i>Expérience de contrôle</i>	38
4.	DISCUSSION	40
5.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	44
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	45
	LISTE DES CONTACTS	48
	TABLE DES ANNEXES.....	49
	ANNEXE 1 : Echelle phénologique du chêne sessile (<i>quercus petraea</i>).....	50
	ANNEXE 2 : Détermination du nombre de tiges à prélever sur le terrain pour l'expérience de débourrement en milieu contrôlé	52
	ANNEXE 3 : Préparation de l'échelle de concentration d'ADN d'oïdium	54
	ANNEXE 4 : Protocole d'extraction d'ADN avec le kit Invisorb®	56
	ANNEXE 5 : Protocole d'extraction d'ADN avec le kit NucleoSpin®	58
	ANNEXE 6 : Détermination du nombre de bourgeons à prélever pour l'expérience de détection de matériel fongique d'oïdium dans les bourgeons	60
	ANNEXE 7 : Protocole d'extraction individuelle d'ADN d'oïdium des chênes	61
	ANNEXE 8 : Gel d'ADN total obtenu lors de l'expérience préliminaire de détection de matériel fongique dans les bourgeons.....	62
	RESUME.....	

Table des figures

Figure 1 — Représentation schématique du mode d'infection des oïdiums.	8
Figure 2 — Régénération de chênes infectés par l'oïdium.	9
Figure 3 — Symptômes dus à l'oïdium.	12
Figure 4 — Distribution des quatre espèces d'oïdium en France.	13
Figure 5 — Cycle biologique supposé pour les quatre lignées liées à l'oïdium des chênes.	14
Figure 6 — Description des formes sexuées des deux principales lignées de l'oïdium des chênes : <i>E. alphitoides</i> et d' <i>E. quercicola</i>	14
Figure 7 — Suivi temporel de l'oïdium des chênes sur deux parcelles	15
Figure 8 — Mise en place de l'expérience test sur le débourrement	19
Figure 9 — Mise en place de l'expérience « débourrement ».	20
Figure 10 — Zone de restriction des régions ITS par les enzymes PVU II, BSR I et BSMA I.	25
Figure 11 — Evolution au cours de l'expérience test du nombre d'individus débourrés entre les types de matériel végétal « plant avec racines » et « tige coupée à la base ».	28
Figure 12 — Pousses drapeaux observées dans deux milieux différents	29
Figure 13 — Comparaison du rendement des kits Invisorb [®] et NucleoSpin [®]	30
Figure 14 — Produits <i>PCR</i> obtenus pour la seconde phase de la <i>nested PCR</i> pour les kits Invisorb [®] et NucleoSpin [®]	31
Figure 15 — Résultats de l'extraction d'ADN sur les groupes de bourgeons	32
Figure 16 — Arbre phylogénétique pour les groupes de bourgeons positifs	34
Figure 17 — Résultats de l'extraction d'ADN sur les bourgeons individuels.	35
Figure 18 — Arbre phylogénétique pour les bourgeons individuels positifs	37
Figure 19 — Résultats de l'extraction d'ADN sur les échantillons de contrôle.	39
Figure 20 — Description de la cellule de Malassez.	54

Table des tableaux

Tableau 1 — Position taxonomique des oïdiums.	9
Tableau 2 — Historique de l'oïdium des chênes.	10
Tableau 3 — Proportion des réactifs de la <i>nested PCR</i>	23
Tableau 4 — Proportion des réactifs de la digestion enzymatique.....	25
Tableau 5 — Résultats de la comparaison du débourrement entre les types de matériel végétal « plant avec racines » et « tige coupée à la base ».	28
Tableau 6 — Résultats de la <i>nested PCR</i> pour les kits Invisorb® et NucleoSpin®	31
Tableau 7 — Résultats de la <i>nested PCR</i> effectuée sur l'ADN extrait à partir des groupes de bourgeons.	33
Tableau 8 — Résultats de la digestion enzymatique sur les groupes de bourgeons.	33
Tableau 9 — Résultats des recherches d'homologues obtenus pour les huit séquences ITS obtenues à partir d'ADN extraits sur des groupes de bourgeons.	33
Tableau 10 — Résultats de la <i>nested PCR</i> effectuée sur l'ADN extrait à partir des bourgeons individuels.	35
Tableau 11 — Résultats de la digestion enzymatique sur les bourgeons individuels.	35
Tableau 12 — Résultats des recherches d'homologues obtenus pour les neufs séquences ITS obtenues à partir d'ADN extraits sur des bourgeons.....	36
Tableau 13 — Caractéristiques des bourgeons contenant du matériel fongique d'oïdium.	38
Tableau 14 — Résultats du calcul de la probabilité d'avoir à la fois du débourrement et des pousses drapeaux.	52
Tableau 15 — Détermination du nombre d'échantillons à prélever sur le terrain en fonction du taux de débourrement et du taux de présence de pousses drapeaux.	53

Index alphabétique

- ADN : acide désoxyribonucléique
- BBCH : *biologische bundesanstalt bundessortenamt und chemische industrie*
- BIOGECO : biodiversité, gènes et communautés
- BLAST : *basic local alignment search tool*
- bp : *base pair*
- CAPS : *cleaved amplified polymorphism sequences*
- CTAB : bromure d'hexadécyltriméthylammonium
- DSF : département de santé des forêts
- INRA : institut national de la recherche agronomique
- ITS : *internal transcribed spacer*
- Kb : kilo base
- NCBI : *national center for biotechnology information*
- PCR : *polymerase chain reaction*
- rpm : *rotation per minute*
- UMR : unité mixte de recherche

1. Introduction

1.1. Quelques bases d'épidémiologie

Le terme épidémie est communément utilisé pour qualifier un développement soudain et rapide ou étendu d'une maladie. Une épidémie commence habituellement à des niveaux de sévérité bas : seul un petit nombre de plantes est touché et une petite quantité de tissus des plantes est affectée. Avec le temps, le nombre d'individus touchés s'accroît en fonction de l'augmentation de la sévérité de la maladie. Néanmoins, le nombre d'individus infectés ne peut augmenter continuellement et l'épidémie va se stabiliser à un certain seuil pouvant être proche du niveau de 100 % d'individus touchés (ARNESON, 2001).

L'impact de la maladie et les pertes qui lui sont dues, sont fonction de sa progression. Par conséquent, il est nécessaire de comprendre son fonctionnement, ses progrès et les facteurs qui vont l'influencer afin de réduire son impact. Il n'est pas nécessaire d'éradiquer la maladie pour réduire cet impact, d'autant plus qu'une éradication n'est jamais réalisable en totalité. Garder son développement sous un niveau acceptable est plus judicieux. (ARNESON, 2001).

Les épidémies sont des phénomènes cycliques, basées sur la répétition de cycles de développement d'un agent pathogène en relation avec son hôte et son environnement. L'inoculum (spores sexuées ou asexuées de champignons, bactéries, nématodes, virus...) pénètre et s'établit dans les tissus de l'hôte au cours du processus d'infection. L'agent pathogène se développe ensuite dans l'hôte et commence à produire un nouvel inoculum qui peut être dispersé, et engendrer de nouvelles infections.

Ils existent deux types de développement cycliques (AGRIOS, 2005) :

- les développements monocycliques : armillaires responsables de pourritures racinaires telles qu'*Armillaria mellea*, (AGRIOS, 2005),
- les développements polycycliques : oïdium des arbres fruitiers (*Podosphaera leucotricha*), mildiou de la pomme de terre causé par *Phytophthora infestans* (AGRIOS 2005).

Pour les maladies polycycliques, les différentes générations d'inocula produites par l'agent pathogène sont généralement disséminées par voie aérienne et sont responsables de maladies qui vont causer des épidémies affectant un grand nombre de plantes. Ces épidémies sont constituées d'un inoculum primaire correspondant à des spores sexuées et d'un inoculum secondaire correspondant à des spores asexuées. (AGRIOS, 2005)

Dans certains cas il est difficile de dire si le développement est monocyclique ou polycyclique. La combinaison de ces deux développements s'observe sur les épidémies produites par des champignons qui présentent deux stades de spores (ascospores et conidies : spores asexuées), le développement de ces deux stades pouvant se faire distinctement ou simultanément.

1.2. Les oïdiums

Les oïdiums ou erysiphacées sont des ascomycètes appartenant au règne des champignons (Tableau 1) qui affectent essentiellement les feuilles mais également les tiges, les fleurs et les fruits de près de 10 000 espèces d'angiospermes, dicotylédones ou monocotylédones (GLAWE, 2008). Ceux-ci se caractérisent par un feutrage mycélien blanchâtre produisant une quantité considérable de conidies donnant cet aspect poudreux à l'origine de leur nom (GLAWE, 2008). Les oïdiums sont des parasites biotrophes obligatoires : ils ne peuvent se développer que sur les tissus vivants de leur hôte (GLAWE, 2008). Par conséquent, il est impossible de les cultiver sur des milieux artificiels.

Du fait de leur biotrophie, les oïdiums développent lors de l'infection de l'hôte des appressoria et des haustoria (suçoirs) (Fig.1). Cette dernière structure correspond à l'invagination d'une cellule fongique le long de la membrane d'une cellule hôte. Elle est spécialisée dans la sécrétion de protéines effectrices impliquées dans l'inhibition des mécanismes de défense de l'hôte et la dérivation de ses substances nutritives (GLAWE, 2008). Les feuilles infectées par l'oïdium subissent une diminution de l'activité photosynthétique comparée à celle de feuilles saines (GLAWE, 2008 ; MOUGOU-HAMDANE, 2009 ; DESPREZ-LOUSTAU, 2002).

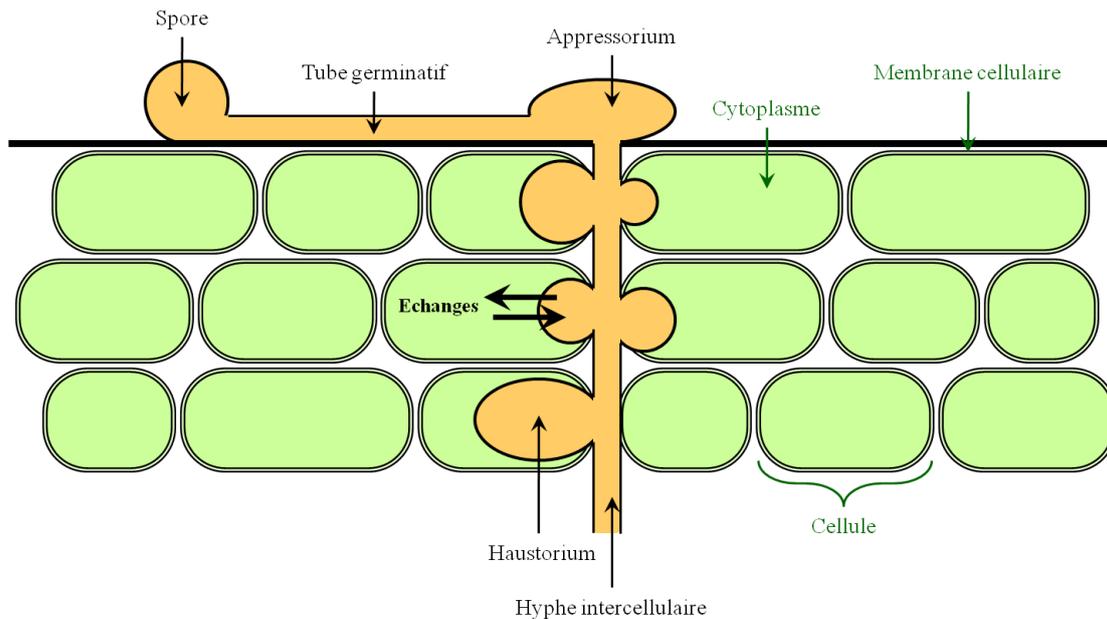


Figure 1 — Représentation schématique du mode d'infection des oïdiums.

1.3. L'oïdium des chênes

L'oïdium des chênes est une des maladies fongiques les plus courantes sur les chênes Européens et fait partie des maladies les plus fréquentes sur cette essence forestière en France (NAGELEISEN, 2000). C'est une maladie familière, pour les forestiers et le grand public du fait de la facilité à l'identifier (Fig. 2).

Les semis de chênes sont les organes les plus sensibles face à l'oïdium des chênes qui entraîne chez eux une mortalité considérable (SOUTRENON, 1998). De plus, il engendre une réduction importante de la hauteur sur de nombreux sujets (SOUTRENON, 1998). Par conséquent, la maladie pose de sérieux problèmes au niveau des régénérations naturelles et des jeunes plantations, ainsi qu'au niveau de la production de plants en pépinière (SOUTRENON, 1998 ; DESPREZ-LOUSTAU, 2002). Les rejets de cèpée à croissance vigoureuse sont également touchés par l'oïdium des chênes (DESPREZ-LOUSTAU, 2002). Par ailleurs, ce dernier serait un facteur participant au dépérissement des arbres adultes. En effet, plusieurs auteurs mentionnent que l'oïdium associé à l'attaque d'insectes défoliateurs ou à l'impact de la sécheresse serait à l'origine de la mortalité des chênes adultes (DESPREZ-LOUSTAU, 2002).

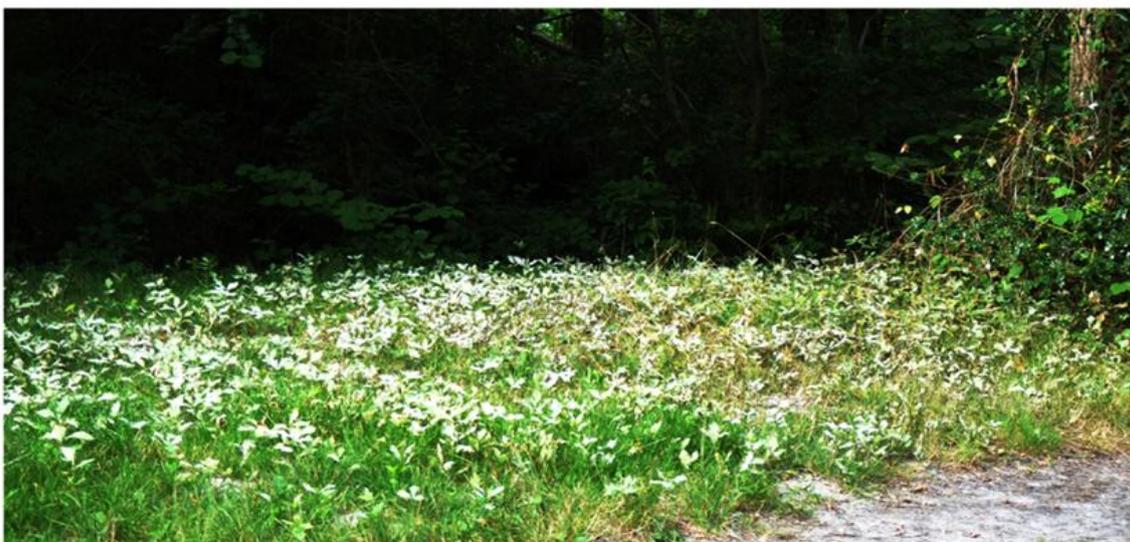


Figure 2 — Régénération de chênes infectés par l'oïdium.

1.3.1. Taxonomie de l'oïdium des chênes

De récents travaux moléculaires ont identifié quatre lignées évolutives qui coexistent sous le même symptôme de feutrage mycélien blanc du à l'oïdium des chênes, et suggéré l'existence d'un complexe « d'espèces cryptiques¹ » pour cette maladie liée aux espèces *Erysiphe alphitoides*, *E. hypophylla*, *E. quercicola* et *Phyllactinia* sp. (MOUGOU-HAMDANE et al. 2008).

L'utilisation d'outils moléculaires a permis de clarifier la taxonomie au niveau de ces quatre lignées d'oïdium qui s'attaquent aux chênes en Europe. En effet, des études sur les polymorphismes des régions intergéniques transcrites (*internal transcribed spacers*, ITS) de l'ADN ribosomal (ADNr) nucléaire ont permis i. de différencier ces quatre lignées morphologiquement identiques puis ii. de rattacher trois de ces lignées à des espèces décrites sur les chênes en Europe (*E. alphitoides* et *E. hypophylla*) et au Japon (*E. quercicola*). La quatrième lignée serait liée au genre *Phyllactinia*. (TAKAMATSU et al., 1999 ; TAKAMATSU et al. 2007) (Tableau 1). A noter que deux de ces quatre lignées identifiées en Europe sont homologues à des espèces retrouvées (*E. alphitoides*) ou décrites (*E. quercicola*) au Japon (MOUGOU-HAMDANE et al., 2010).

Tableau 1 — Position taxonomique des oïdiums. Source : Index Fungorum (www.indexfungorum.org).

Classification		
Règne	<i>Fungi</i>	
Sous-règne	<i>Dikarya</i>	Présence d'une dicaryophase
Embranchement	<i>Ascomycota</i>	Spores sexuées internes (asques)
Sous-embranchement	<i>Pezizomycotina</i>	Hyphes septés
Classe	<i>Leotiomycetes</i>	Asques se développant dans des apothécies ou des chasmothèces
Ordre	<i>Erysiphales</i>	Présence de chasmothèces
Famille	<i>Erysiphaceae</i>	Fulcres sur les chasmothèces
Genre	<i>Erysiphe</i> (1) <i>Phyllactinia</i> (2)	(1) Fulcres hyalins, à croissance limitée et aux ramifications dichotomiques
		(2) Fulcres raides, renflés en ampoule à la base
Espèces	<i>alphitoides</i> <i>quercicola</i> <i>hypophylla</i>	

¹ Espèces cryptiques : Espèces phénotypiquement similaires mais qui génétiquement présentent des différences notables

1.3.2. Historique de la maladie

Le tableau 2 retrace l'histoire de la maladie.

Tableau 2 — Historique de l'oïdium des chênes (d'après MOUGOU-HAMDANE et al., 2008 ; DESPREZ-LOUSTAU, 2002 ; BRAUN et TAKAMATSU, 2000 ; TAKAMATSU et al., 2007).

Date	Evènements
Avant 1907	Des symptômes d'oïdium sur chênes sont observés de façon très sporadique en Europe (Suisse, Italie, Portugal voire même la Russie).
1907	Les premiers foyers épidémiques sont observés en France en particulier à Paris et dans quelques régions françaises. L'agent pathogène fait son apparition en Espagne, au Luxembourg et aux Pays-Bas.
1908	La maladie a débuté au printemps bien plus tôt comparé à l'année précédente. L'oïdium est à présent observé sur l'ensemble de la France mais également dans de nombreux autres endroits en Europe : Royaume-Uni, Allemagne, Autriche, Belgique, Portugal, Italie, Scandinavie, Suisse ainsi que la Corse et l'Algérie.
1909	La Russie et la Turquie sont affectées.
1911	La forme sexuée est observée pour la première fois dans le Gard : <i>Microsphaera alphitoides</i> est décrit. Il sera renommé plus tard <i>Erysiphe alphitoides</i> . A partir de 1911, l'épidémie commence à décliner. Plusieurs hypothèses sur ce déclin sont émises : implication d'un hyperparasite <i>Ampelomyces quisqualis</i> (appelé également <i>Cicinnobolus cesatii</i>), effet de la sélection naturelle des chênes avec élimination des individus sensibles et perte de la virulence de l'agent pathogène.
1912	L'oïdium des chênes est observé au Brésil.
1950	Une nouvelle espèce observée tout d'abord en Russie puis en Norvège ainsi que dans l'Est de l'Europe notamment la Slovénie est décrite : <i>Microsphaera hypophylla</i> renommé à présent <i>Erysiphe hypophylla</i>
2007	<i>Erysiphe quercicola</i> est décrit en Asie. <i>Erysiphe quercicola</i> n'est pas décrit en France mais des individus ayant des régions ITS strictement identiques à cette espèce sont détectées en France.

L'origine des agents pathogènes responsables de l'oïdium des chênes a été longuement débattue et ce débat est toujours d'actualité. En effet, compte-tenu de sa soudaine occurrence et de son fort impact sur ses hôtes, l'introduction en Europe d'un agent pathogène exotique semble l'hypothèse la plus probable pour expliquer l'origine de cette maladie. Une introduction d'origine américaine a, dans un premier temps, été privilégiée par analogie avec l'origine et l'introduction de l'oïdium de la vigne (*Erysiphe necator*) (DESPREZ-LOUSTAU, 2002). En outre, les chênes appartenant à la section botanique des « chênes rouges américains » (section *Erythrobalanus*) sont affectés en Amérique du Nord par des oïdiums. Cette origine reste toutefois controversée, d'autant plus que les chênes d'Amérique sont peu ou pas sensibles à l'oïdium des chênes européens (DESPREZ-LOUSTAU, 2002). Une hypothèse alternative serait l'introduction par le biais des plantes exotiques, importées des colonies aux XVIII^e et XIX^e siècles, de l'agent pathogène étant donné que l'oïdium avait été observé en Europe avant 1907, tout particulièrement au Portugal en 1877 (MOUGOU-HAMDANE et al., 2008).

Cette hypothèse semble plus probable que l'introduction d'origine américaine d'autant plus que l'idée d'un changement d'hôte (hypothèse du « saut d'hôte » ou « *host jump* » ;(CROUS et al., 2004)) est soutenue par certains auteurs (MOUGOU-HAMDANE et al., 2008). En effet, les séquences ITS d'*E. alphitoides* et d'*E. quercicola* sont respectivement identiques à celle de l'*Oïdium mangiferae* et *O. heveae* (LIMKAISANG et al., 2006 ; TAKAMATSU et al., 2007). De plus le fait, que les organes reproducteurs sexués n'aient été observés en Europe que plusieurs années après le début de l'épidémie suggère une adaptation d'un parasite à un nouvel hôte (MOUGOU-HAMDANE et al., 2008).

1.3.3. Symptômes et dégâts de la maladie

Cette maladie est facilement identifiable car comme pour tous les oïdiums, elle se caractérise par des symptômes en taches poudreuses sur les feuilles. L'oïdium des chênes se caractérise en particulier par deux symptômes distincts mais de fréquences très différentes :

- le symptôme dit de « pousse drapeau » associé à *E. quercicola* apparaît au début du printemps (fin du mois d'avril, début du mois de mai) (Fig. 3a). Il serait issu de l'infection des bourgeons durant l'année précédant l'apparition de la pousse qui engendrera le développement d'un mycélium dense sur les nouvelles feuilles (DESPREZ-LOUSTAU, 2002 ; KERLING 1966). Sa fréquence de présence est faible : 0,26 % en 2009 ; 0,47 % en 2008 (D. PIOU, communication personnelle)
- un symptôme plus commun présent de fin mai à septembre (Fig. 3b). Ce symptôme est facilement repérable et identifiable puisque le mycélium de l'oïdium recouvre les feuilles, soit entièrement ou soit sous la forme de taches sporulantes. (LANIER et al., 1976). En Europe, ce symptôme est causé par les différentes formes du complexe cryptique : *E. alphitoides*, *E. hypophylla*, *E. quercicola*, *Phyllactinia* sp. (MOUGOU-HAMDANE et al., 2010 ; FEAU et al., 2010)

L'infection au niveau des feuilles engendre par la suite des dommages sur celles-ci en particulier des altérations foliaires (cf. figure 3c, d, et e) : jaunissement, nécroses, dessèchement pouvant aboutir dans les cas les plus sévères à une chute foliaire prématurée (DESPREZ-LOUSTAU, 2002).

Bien que le terme « oïdium des chênes » soit utilisé, tous les chênes n'ont pas la même sensibilité face à celui-ci. En effet, les chênes à feuilles caduques (*Quercus robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens* (section *Lepidobalanus*) et *Q. pyrenaica* (section *Mesobalanus*)) sont plus sensibles comparés aux espèces sempervirentes indigènes (*Quercus ilex* (section *Lepidobalanus*), *Q. cerris*, *Q. suber* et *Q. coccifera* (section *Cerris*)) qui sont peu attaquées et sont considérées comme résistantes (LANIER et al., 1976 ; DESPREZ-LOUSTAU, 2002). Au sein des essences caduques, *Quercus robur* est le plus sensible suivi de *Q. pyrenaica*, puis de *Q. pubescens* et de *Q. petraea*. Enfin, parmi les essences introduites, *Quercus rubra* (section *Erythrobalanus*) est peu sensible à l'oïdium (LANIER et al., 1976 ; DESPREZ-LOUSTAU, 2002). A noter que *E. alphitoides* a également été rapporté sur *Castanea sativa* et *C. crenata* ainsi que sur *Fagus sylvatica* (DESPREZ-LOUSTAU, 2002).



a



b



b



d



d

Figure 3 — Symptômes dus à l'oïdium. (a) Pousse drapeau. (b) Symptôme commun. (c) Jaunissement. (d) Nécroses. (e) Dessèchement.

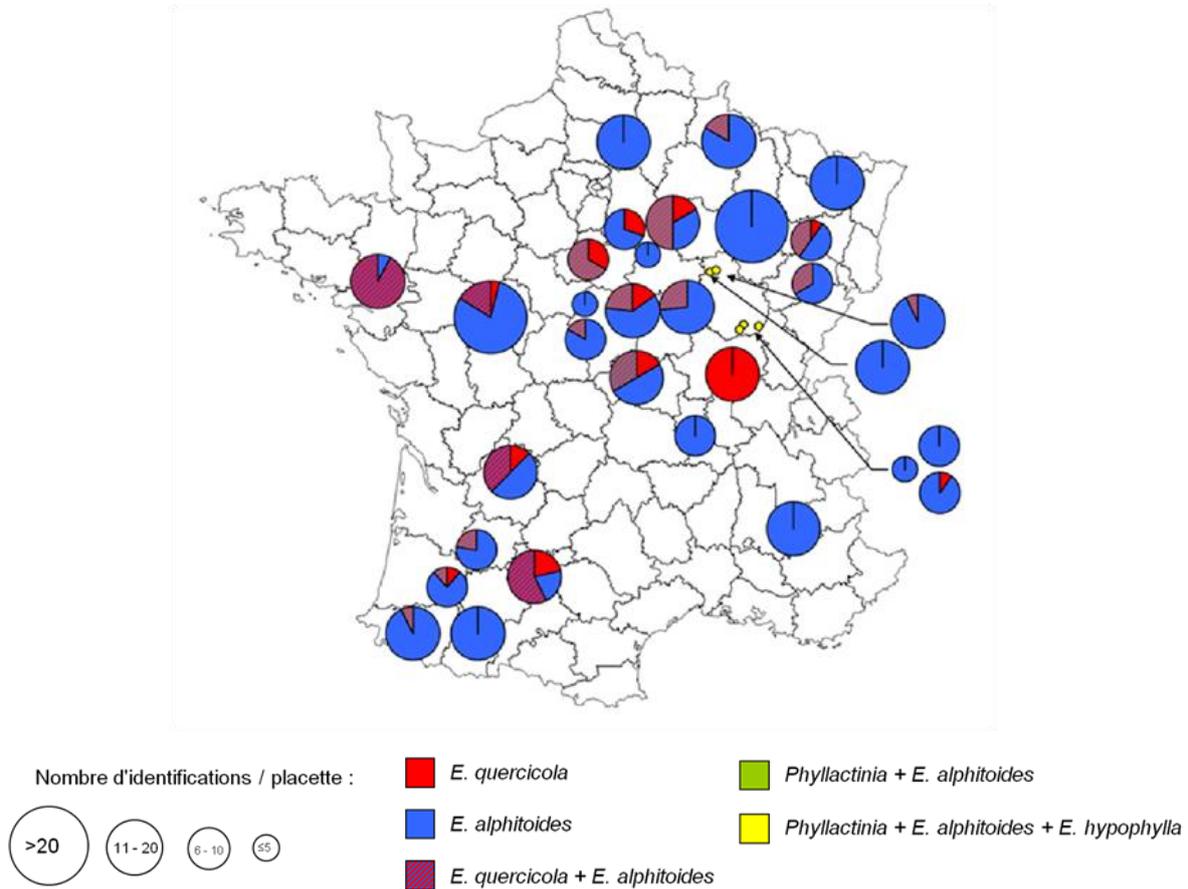
1.3.4. Distribution spatiale de la maladie

L'oïdium des chênes, comme indiqué précédemment dans l'historique, est présent dans de nombreux pays d'Europe mais touche également l'Asie et plus récemment l'Afrique du Sud, l'Amérique du Nord et du Sud ainsi que l'Océanie (DESPREZ-LOUSTAU, 2002). De ce fait, le parasite présente une aire de distribution mondiale qui recouvre celle de ces hôtes.

Au niveau de la France, la distribution spatiale des quatre espèces dans les peuplements de chênes est sympatrique et ce, quelque soit l'échelle considérée – région, altitude, arbre et même

lésion – de plus la distribution n'est pas équiprobable : *E. alphitoides* et *E. quercicola* sont les deux espèces les plus fréquentes (respectivement 83 % et 14 %) alors que *E. hypophylla* est présent à 3% et *Phyllactinia sp.* à 1 % (MOUGOU-HAMDANE et al. 2010) (Fig. 4)

Figure 4 — Distribution des quatre espèces d'oïdium en France, résultats de l'enquête DSF 2009, source : FEAU et al., 2010.



1.3.5. Cycle biologique

Le cycle biologique de l'oïdium des chênes suit un développement polycyclique (Fig. 5), qui présente donc deux formes de reproduction :

- une forme sexuée ou téléomorphe. Elle est caractérisée par la présence de fructifications de type sexuées sphériques : les chasmothèces. Leur couleur varie dans le temps : d'abord jaune, elles virent au marron avant de devenir noir, signe de leur maturité. Des fulcres, ramifiés dichotomiquement à leur sommet, se situent à la surface des chasmothèces. Ces appendices filamenteux possèdent une ornementation caractéristique et permettent l'identification des différentes espèces. Enfin chaque chasmothèce contient des ascospores renfermant huit ascospores en moyenne. (Fig. 6)
- une forme asexuée ou anamorphe. Elle se caractérise par la présence de mycélium à partir duquel sont formées les conidies ou oïdies (30-36 x 12-18 µm). Il s'agit de la forme la plus facilement visible.

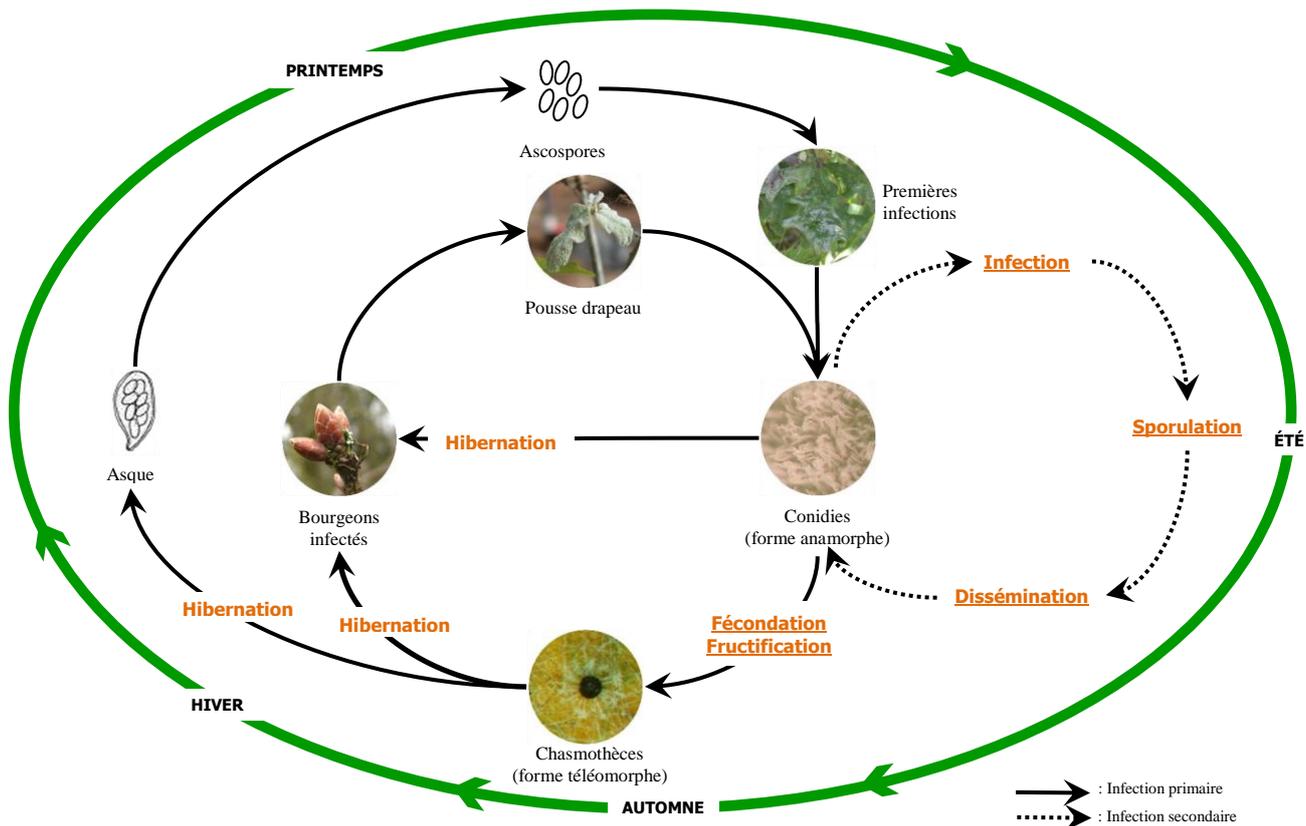


Figure 5 — Cycle biologique supposé pour les quatre lignées liées à l'oïdium des chênes.

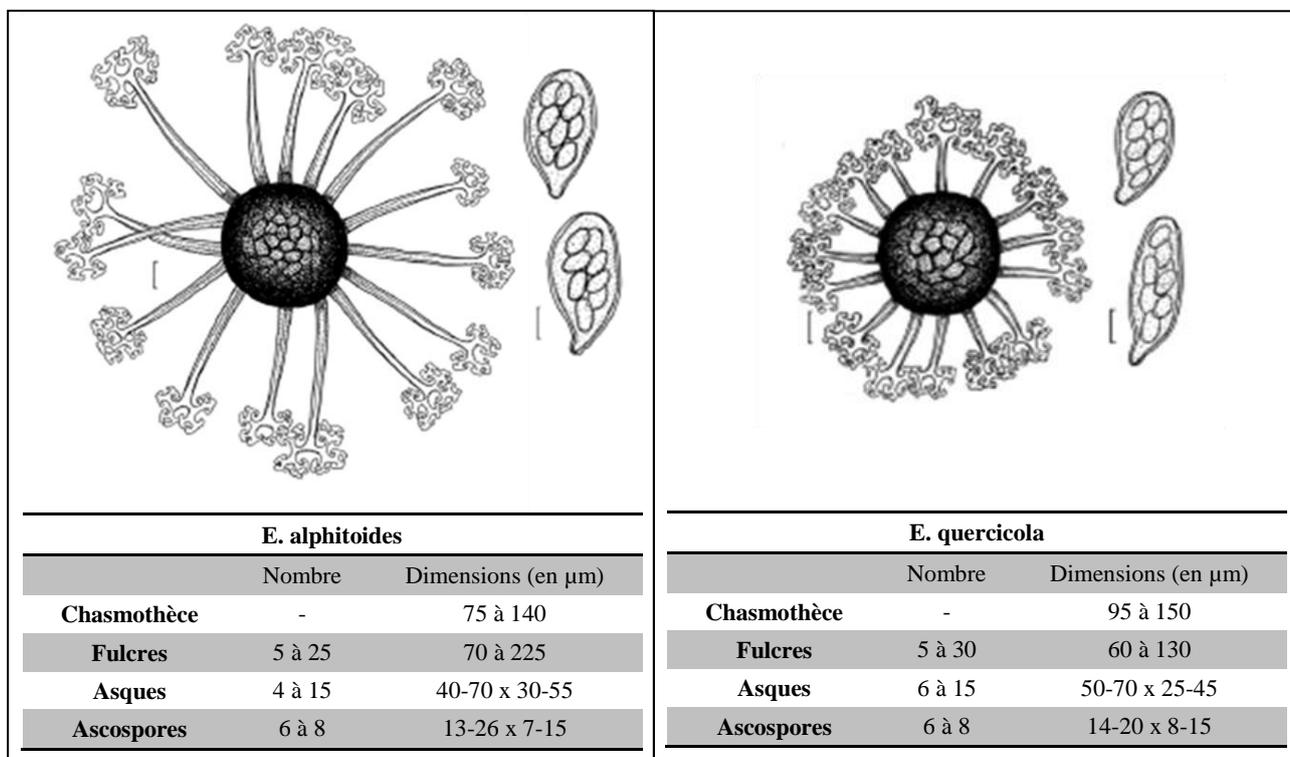


Figure 6 — Description des formes sexuées des deux principales lignées de l'oïdium des chênes : *E. alphitoides* et d'*E. quercicola*. Echelle = 25 µm (chasmothèces), 10 µm (asques) (TAKAMATSU et al., 2007).

Les deux formes ont été décrites pour les quatre espèces du complexe cryptique. Toutefois en France, les chasmothèces d'*E. quercicola* n'ont jamais été trouvées alors que ceux des trois autres ont déjà pu être identifiés (N. FEAU et M-L. DESPREZ-LOUSTAU, communication personnelle).

Cette maladie polycyclique se compose de trois phases : une phase d'infection, une phase de sporulation et une phase de dissémination. Elle débute au printemps avec l'apparition de pousses drapeaux liées à *E. quercicola*. Celles-ci produisent du mycélium dont la reproduction asexuée (différenciation cellulaire mycélienne) engendre des conidiophores¹ générant des conidies isolées ou en chaînettes très courtes (LANIER et al., 1978). La dissémination par le vent ou la pluie de ces conidies sur de nouvelles feuilles est à l'origine d'infections primaires. Leur germination produit un nouveau mycélium qui génère à son tour de nouvelles conidies dont la dissémination assure les infections secondaires. Les pousses drapeaux peuvent être observables de mi-avril jusque fin mai. (Fig. 7). Leur présence décroît dans le temps pour laisser la place aux symptômes liés principalement à *E. alphitoides*. L'origine de ces pousses drapeaux reste inconnue, néanmoins, KERLING (1966) suppose que ces pousses drapeaux sont induites par du mycélium qui viendrait infecter les bourgeons se formant sur les unités de croissance d'août avant que ceux-ci ne rentrent en dormance.

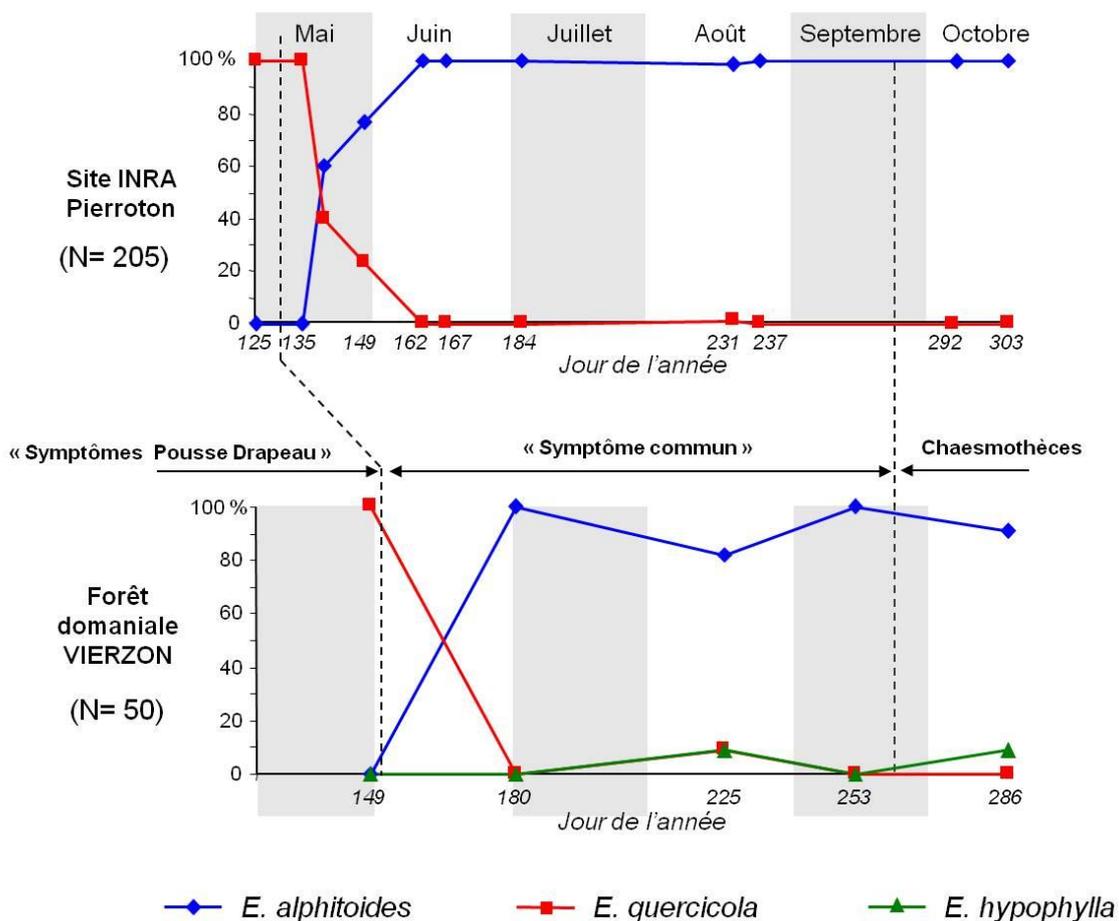


Figure 7 — Suivi temporel de l'oïdium des chênes sur deux parcelles (Site INRA de Pierroton et Forêt domaniale de Vierzon). Source : FEAU et al., 2010.

¹ Conidiophores = hyphes aériens portant une ou plusieurs conidies

En parallèle, les chasmothèces d'*E. alphitoides* (mais également en moindre fréquence d'*E. hypophylla* et *Phyllactinia sp.*) libèrent, courant Mai, des ascospores (inoculum primaire) (Fig. 7) environ une dizaine de jours après le débourrement (MARÇAIS et al., 2009) qui vont germer sur des feuilles. A noter que la production d'ascospores est maximale 30 à 50 jours après le débourrement (MARÇAIS et al., 2009). Ces ascospores vont produire un mycélium qui comme pour les pousses drapeaux générera des conidies à l'origine des infections secondaires.

A la fin de l'été, l'oïdium, supposé être un champignon hétérothallique, produit des chasmothèces issus de la fusion de deux hyphes mycéliens de types sexuels différents (DESPREZ-LOUSTAU, 2002). Ces fructifications sexuées vont se détacher des feuilles et passer l'hiver dans les anfractuosités des écorces comme c'est le cas pour *E. necator*, responsable de l'oïdium de la vigne (CORTESE, 1997). Les conidies pourraient également passer l'hiver dans les craquelures des écorces (LANIER et al., 1976).

L'oïdium est un parasite photo-xérophyte (DESPREZ-LOUSTAU, 2002). Ainsi les conditions optimales pour la germination des conidies se situent entre 20 et 25°C (MOUGOU-HAMDANE, 2009 ; DESPREZ-LOUSTAU, 2002). Etant un parasite xérophyte, l'oïdium peut se développer dans des conditions de faible humidité mais un taux d'humidité de 76 à 96 % est favorable pour la germination des conidies (MOUGOU-HAMDANE, 2009 ; DESPREZ-LOUSTAU, 2002). Néanmoins, l'eau libre est inhibitrice et la pluie a un effet mécanique négatif sur le développement de l'oïdium (DESPREZ-LOUSTAU, 2002). Enfin, des études ont montré que les radiations UV avaient un effet positif sur le développement d'*E. alphitoides* (NEWSHAM et al., 2000 ; 1997)).

1.3.6. Moyens de lutte

L'oïdium est très sensible au soufre par conséquent, suite à l'apparition de la maladie, les premiers traitements ont été réalisés à base de soufre avant l'utilisation de fongicides de contact (dérivés du phénol) ou systémiques (bénomyl). Plus récemment, des inhibiteurs de biosynthèses des stérols (IBS) ont montré leur efficacité. (LANIER et al, 1976 ; DESPREZ-LOUSTAU, 2002).

L'utilisation de traitements fongicides s'effectue essentiellement sur les jeunes plants notamment en pépinière voire en régénération (DESPREZ-LOUSTAU, 2002). L'application est aisée pour le cas des pépinières mais bien plus difficile en forêt (LANIER et al., 1976).

Par ailleurs, des recherches sont effectuées sur des méthodes de lutte alternative : utilisation d'extraits de végétaux ou de l'hyperparasitisme mais pour le moment ces méthodes ne sont pas utilisables (DESPREZ-LOUSTAU, 2002)

1.4. Problématique

Le suivi annuel du département de la santé des forêts (DSF) sur les pousses drapeaux associées, à présent, uniquement à l'espèce *E. quercicola* (FEAU et al., en préparation), a révélé des taux de présence très faible pour ces dernières en 2008 et 2009 (respectivement 0,47 % et 0,26 %). De tels résultats suscitent des interrogations quant au rôle joué par ces pousses drapeaux dans la mise en place d'une épidémie oïdium. Néanmoins et malgré ces fréquences faibles, un rôle non négligeable de ces pousses drapeaux pour l'initiation de la maladie chaque année semble vraisemblable, en permettant une dissémination précoce (en tout début de la saison épidémique) de la maladie via les conidies libérées par ces pousses drapeaux. Cette libération d'inoculum primaire coïncidant en outre parfaitement avec le débourrement et la formation des pousses primaires des chênes à ce moment de la saison, favorisant l'installation de la maladie.

De plus, un décalage temporel entre l'observation de ces pousses drapeaux et la présence d'infections dues à *E. alphitoides* a été observé (Fig. 7)

La coexistence de ces deux espèces (les plus fréquemment retrouvées en France), pourrait être expliquée par cette différenciation d'ordre temporel. Cette succession pourrait avoir pour origine des différences de stratégies écologiques lors de l'hivernation et de l'initiation de la saison épidémique de la maladie au début du printemps : soit à partir des chasmothèces pour *E. alphitoides*, soit à partir des pousses drapeaux pour *E. quercicola*. Etant donné que les chasmothèces de ce dernier sont rarement observés à l'opposé de ceux d'*E. alphitoides* qui sont fréquemment détectés sur les feuilles de chênes au cours de l'automne, il est supposé que les pousses drapeaux sont associées à un mode de conservation hivernale d'*E. quercicola* sous la forme de matériel fongique (mycélium ou conidies) (KERLING, 1966). La présence de matériel fongique serait liée à l'oïdium dans des bourgeons de chênes en dormance mais cela n'a toutefois jamais été formellement démontré. Une question sous-jacente à cette supposition est que l'espèce *E. quercicola* présenterait un cycle polycyclique « modifié » avec un mode de conservation hivernal asexué au lieu du mode sexué plus classique présenté par les agents pathogènes polycycliques.

La validation de cette hypothèse est importante dans la compréhension du fonctionnement des cycles biologiques des différentes espèces responsables de l'oïdium des chênes en France.

Afin de montrer que les pousses drapeaux sont bien associées à un mode de conservation hivernal d'*E. quercicola* sous la forme de matériel fongique (mycélium, conidies, chasmothèces), deux expérimentations complémentaires seront réalisées. Tout d'abord des tiges ou des plants de chênes potentiellement infectés par *E. quercicola* seront récoltés en France dans des peuplements forestiers de *Quercus petraea* et *Q. robur* présentant le symptôme pousses drapeaux (parcelles avec au moins 5 % de pousses drapeaux en Avril-Mai) suite à des notations réalisées par le département de la santé des forêts en 2009. Ces prélèvements seront transférés et maintenus en survie dans des conditions contrôlées (en serre) jusqu'au débourrement des feuilles de façon précoce et à l'éventuelle observation de symptômes pousses drapeaux. Simultanément une expérience utilisant une technique de diagnostic moléculaire des différentes espèces du complexe « oïdium des chênes » (PCR et CAPS (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*) basés sur des polymorphismes interspécifiques retrouvés dans l'ADN ribosomal nucléaire) permettra de vérifier la présence de matériel fongique lié à une ou plusieurs de ces espèces dans les bourgeons de chênes en dormance.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Débourrement de tiges de chênes en milieu contrôlé

L'objectif de cette expérience vise à déterminer si du matériel fongique (mycélium ou conidies) lié à une ou plusieurs des quatre lignées responsables de l'oïdium des chênes, hiberne dans les bourgeons avant de générer un symptôme dit de « pousse drapeau ». Si c'est le cas, la présence de pousses drapeaux sera constatée lors du débourrement. Des expériences similaires, portant sur l'hibernation de matériel fongique dans des bourgeons, ont déjà été menées sur l'oïdium de la vigne (*Erysiphe necator*) (SALL et WRYSINSKI, 1981 ; RÜGNER et al, 2002 ; RUMBOLZ et GUBLER, 2005) et serviront de base pour cette expérience sur l'oïdium des chênes.

2.1.1. Test préliminaire

Avant de mettre l'expérience en place, un test préliminaire est réalisé afin de déterminer quel type de matériel végétal (plants avec racines ou tiges coupées au niveau du collet), présente le meilleur de taux de débourrement. Ce résultat est essentiel car il permettra de déterminer, d'une part, si les prélèvements sur le terrain se feront sous la forme de tiges ou de plants et d'autre part, le nombre d'échantillons à récolter. Ces questions sont en outre primordiales puisque le temps de travail passé sur le terrain pourra varier du simple au double suivant le type de récolte effectué (tiges ou plants avec racines).

2.1.1.1. Matériel végétal

Dix tiges de chênes et dix plants de chênes, mesurant entre 30 et 70 cm, ont été récoltés en février 2010 sur le domaine de l'INRA de Pierroton. Le nombre d'échantillons a été fixé arbitrairement.

2.1.1.2. Mise en place du test

Les dix tiges sont placées dans un seau contenant de l'eau (provenant du robinet). Le bout des tiges baignant dans l'eau est coupé de 2 à 3 cm. Cette coupe s'effectue dans l'eau à l'aide d'un sécateur afin d'éviter que des bulles d'air viennent obstruer les vaisseaux conducteurs de la tige conduisant ainsi à une mort plus rapide des sujets.

Les dix plants sont, quant à eux, installés dans des plaques horticoles présentant les caractéristiques suivantes :

- largeur : 280 mm
- longueur : 360 mm
- profondeur : 180 mm
- nombre de trous : 12 (3 x 4)
- dimension des trous : 80 x 80 mm
- volume d'un trou : 650 cm³

Ils sont plantés dans un mélange classique à base de tourbe et de vermiculite (Fig. 8) et sont ensuite arrosés abondamment puis égouttés jusqu'au point de ressuyage.

Les tiges et les plants sont ensuite placés dans une chambre climatique à 20°C avec la photopériode suivante : 16 h de jour et 8 h de nuit.

Une numérotation est mise en place afin de faciliter le suivi du test : T1 à T10 pour les tiges et P1 à P10 pour les plants.

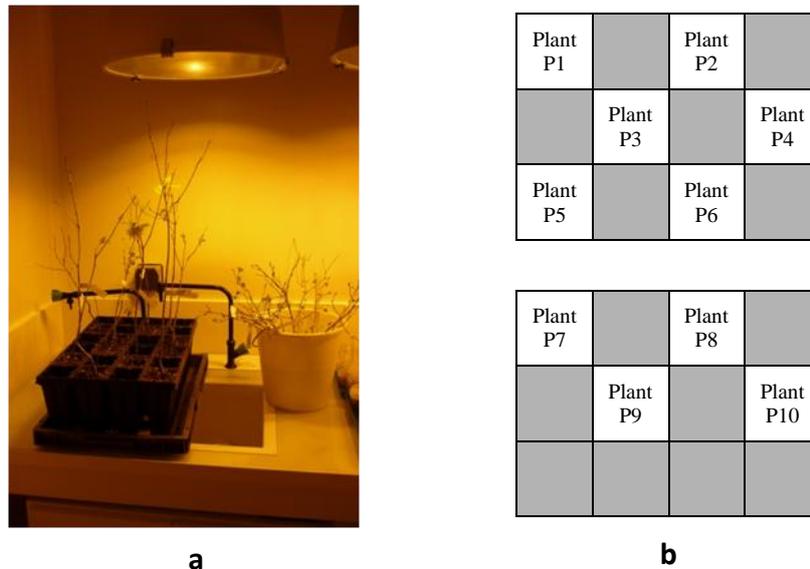


Figure 8 — Mise en place de l’expérience test sur le débourrement. (a) Photographie des plants en plaques et des tiges placées dans un seau d’eau. (b) Plan des plaques de plants.

2.1.1.3. Suivi du test.

Un contrôle régulier est effectué sur les échantillons afin de noter la date de débourrement de chaque sujet. Le stade phénologique est également relevé. Pour cela, l’échelle phénologique pour le chêne sessile (SECONDAT, 2008), adaptée de l’échelle BBCH (MEIER, 2001), qui sert à codifier les stades phénologiques des mono- et dicotylédones, a été utilisée. (Annexe 1)

2.1.2. Expérience débourrement

2.1.2.1. Matériel végétal

Un total de 212 tiges de chênes (chênes sessile et pédonculé confondus), mesurant entre 30 et 90 cm, ont été récoltées sur la forêt domaniale du Gâvre (44) en mars 2010. La placette est composée de trois transects de 100 m sur chacun desquels est prélevé un tiers du nombre total de tiges à récolter. Ce nombre d’échantillons a été déterminé en fonction du taux de débourrement de l’expérience test préliminaire et le taux de présence de pousses drapeaux sur la forêt relevé lors d’une enquête du DSF effectuée en 2008. (Annexe 2). Ce nombre avait été fixé à 200 tiges.

2.1.2.2. Mise en place

Une fois récoltées, les tiges sont placées dans des plaques horticoles plus grandes que celles de l’expérience test pour des raisons de praticité et présentant les caractéristiques suivantes :

- largeur : 310 mm
- longueur : 530 mm
- profondeur : 170 mm
- nombre de trous : 60 (6 x 10)
- dimension des trous : 50 x 50 mm
- volume d’un trou : 240 cm³

Chaque tige est taillée dans l’eau avec un sécateur pour les raisons indiquées dans l’expérience test. Elles sont ensuite plantées dans un substrat composé à 100 % de vermiculite. Ce

substrat est idéal pour maintenir les tiges dans un milieu fortement humide, se rapprochant ainsi des conditions d'humidité de l'expérience test où les tiges étaient dans un seau d'eau. La technique « seau d'eau » n'a pas été utilisée pour cette expérience car le suivi des tiges aurait été beaucoup moins aisé avec ce dernier qu'avec la technique de plantation.

La disposition des tiges sur les plaques se fait suivant le schéma indiqué sur la figure 9a. Cet agencement, un trou sur deux, permet de laisser de l'espace entre les tiges afin de rendre les observations plus aisées lors du suivi du débourrement. Au final, une plaque contient 30 échantillons.

Une fois remplies, les plaques horticoles sont abondamment arrosées puis placées sous serre dans des bacs remplis d'eau. Le taux d'humidité des plaques est contrôlé régulièrement car celles-ci doivent rester humides en permanence pour maintenir les tiges en vie et permettre leur débourrement.

Afin d'identifier chaque tige, la numérotation suivante est appliquée :

- Chaque plaque horticole reçoit un numéro allant de 1 à 7.
- Une graduation alpha-numérique est mise en place sur chaque plaque :
 - l'axe alphabétique est placé selon l'axe des abscisses (de A à F),
 - l'axe numérique est placé selon l'axe des ordonnées (de 1 à 10)
 - L'origine du repère (A1) est placée dans un coin de la plaque où se situe une tige.

Ainsi chaque tige portera comme numéro : « numéro de plaque – coordonnée en abscisse – coordonnée en ordonnée ». Par exemple : la tige située sur la plaque 5 en C7 portera le numéro : 5C7 (Fig. 9)

10		T		T		T
9	T		T		T	
8		T		T		T
7	T		T		T	
6		T		T		T
5	T		T		T	
4		T		T		T
3	T		T		T	
2		T		T		T
1	T		T		T	
	A	B	C	D	E	F

a



b



c

Figure 9 — Mise en place de l'expérience « débourrement ». (a) Plan de plaque, T : tiges. (b) Vue générale sur les plaques de l'expérience. (c) Zoom sur une plaque.

2.1.2.3. Suivi de l'expérience

Des expériences menées sur l'oïdium de la vigne concernant entre autres le lien entre l'infection des bourgeons et le stade phénologique où l'infection apparaît, avec l'utilisation de l'échelle BBCH, ont servi de base pour mettre en place le suivi de l'expérience (RÜGNER et al, 2002 ; RUMBOLZ et GUBLER, 2005)

Les tiges sont contrôlées tous les deux jours pendant toute la durée de l'expérience. Lors de ces contrôles, le débourrement des bourgeons et la présence de mycélium sur les bourgeons éclos sont vérifiés.

Lorsqu'un débourrement est constaté, les critères suivants sont relevés :

- la date de débourrement
- le stade phénologique (SECONDAT, 2008 ; MEIER, 2001)
- la présence ou non de pousses drapeaux
- le nombre de pousses drapeaux

Si une pousse-drapeau est détectée, les points suivants sont notés :

- la localisation de la pousse au niveau de la tige (haut, milieu, bas)
- le type de bourgeon d'où provient la pousse drapeau : bourgeon terminal ou bourgeon axillaire.
- l'ordre de ramification : ordre 1, 2, 3...

2.2. Détection de matériel fongique dans les bourgeons

Le but de cette expérience est de déterminer au moyen d'un diagnostic par la technique de *PCR* complétée par la méthode *CAPS* que du matériel fongique d'oïdium est présent ou non dans les bourgeons de chènes.

2.2.1. Test préliminaire

Cette étape intermédiaire a pour objectif de i. comparer deux kits d'extraction (kit Invisorb[®] et kit NucleoSpin[®]), et ainsi faire le choix du kit le plus performant pour extraire l'ADN d'oïdium dans des bourgeons et ii. déterminer la sensibilité de la technique *PCR* utilisée.

2.2.1.1. Matériel végétal

Les bourgeons utilisés pour l'expérience proviennent de tiges récoltées en mars 2010 sur une parcelle de chènes du domaine de l'INRA de Pierroton sur lesquelles des pousses drapeaux avaient été observées en 2009. Au total, 60 bourgeons ont été prélevés.

2.2.1.2. Préparation des groupes de bourgeons avant extraction

Huit traitements de bourgeons contenant différentes concentrations d'ADN d'oïdium sont réalisés. Un groupe est composé de cinq quarts de bourgeons différents prélevés à l'aide d'un scalpel (lame bistouri n°11) sous une loupe binoculaire à partir des tiges récoltées. Ces groupes sont ensuite placés dans des tubes « Eppendorf » de 2 mL auxquels une certaine quantité de matériel fongique d'oïdium (conidies ou mycélium d'*E. alphitoides*) est ajouté : traitements contenant 10, 100, 1 000, 10 000, 50 000, 100 000 conidies, un témoin positif (mycélium) et un témoin négatif (quarts de bourgeon de chène sans matériel fongique).

Pour réaliser cette échelle de concentration, une solution mère contenant des conidies prélevées sur des plants de chênes inoculés et conservés en chambre climatique, a été préparée. La quantité de conidies présente dans cette solution a été déterminée grâce à des cellules de Malassez puis des dilutions ont été faites par la suite pour obtenir cette graduation. (Annexe 3)

Les huit traitements sont répétés trois fois.

Suite à ces manipulations, chaque tube est placé pendant, minimum, une heure à -80°C avant d'être lyophilisé toute la nuit pour supprimer toute l'eau que contiennent les échantillons et faciliter l'extraction de l'ADN par la suite.

2.2.1.3. Extraction d'ADN d'oïdium à partir des kits Invisorb[®] et NucleoSpin[®]

L'ensemble de l'expérience est réalisé deux fois (48 tubes au total) afin de tester deux marques de kit d'extraction d'ADN : le kit Invisorb[®] (Invisorb[®] DNA Plant HTS 96 kit) et le kit NucleoSpin[®] (NucleoSpin[®] 96 plant II). Le kit Invisorb[®] est couramment utilisé dans l'unité d'accueil pour extraire l'ADN des bourgeons de chênes et de hêtres et le kit NucleoSpin[®] est, quant à lui, adapté à l'extraction d'ADN sur bourgeons. Nous ne connaissons par l'efficacité de ces deux kits pour extraire de l'ADN de champignon dans des bourgeons.

L'extraction est composée de plusieurs étapes qui diffèrent plus ou moins d'un kit à un autre (Annexes 4 et 5) :

- pour le kit Invisorb[®], elle se compose des phases suivantes : broyage des échantillons, lyse chimique (destruction des membranes plasmiques et des parois végétales des cellules), pré-filtration, accrochage de l'ADN, lavages, séchage et élution de l'ADN.
- pour le kit NucleoSpin[®], elle se compose des phases suivantes : broyage des échantillons, lyse chimique, nettoyage par centrifugation, fixation de l'ADN, lavages, séchage et élution de l'ADN.

5 μL et 2 μL d'ADN total obtenus sont respectivement mis à migrer sur un gel à 0,8 % d'agarose par électrophorèse et dosés par spectrophotométrie (NanoDrop ND 8 000 ; Thermo Scientific) afin d'effectuer une quantification et un contrôle de qualité. La pureté de cet ADN est également vérifiée en mesurant les rapports de densités chromatiques. Les acides nucléiques absorbent majoritairement la lumière à une longueur d'onde de 260 nm tandis que les protéines absorbent majoritairement la lumière à une longueur d'onde de 280 nm. Ainsi le ratio 260/280 permet de mesurer la qualité de l'ADN. Un ratio acceptable doit être compris entre 1,8 et 2.

Les échantillons sont par la suite conservés à -20°C avant leur amplification par *PCR*.

2.2.1.4. Amplification de l'ADN par la technique dite de « *nested PCR* »

Afin d'amplifier de très faibles quantités d'ADN, la technique dite de « *PCR gigognes* » (ou *nested PCR*) a été utilisée. Compte-tenu que nous n'avons aucune idée de la quantité de matériel fongique d'oïdium que peut contenir un bourgeon et en supposant que ces quantités sont très faibles en comparaison à celles du chêne, il est nécessaire d'utiliser une technique capable d'amplifier de faibles quantités d'ADN. Par ailleurs, La gamme de concentration en ADN d'oïdium testée permettra de voir jusqu'à quelle concentration, la *nested PCR* peut amplifier l'ADN de l'agent pathogène.

La première *PCR* permet de discriminer l'ADN de champignon de tout autre ADN grâce à l'utilisation d'amorces universelles aux champignons : ITS 1F et ITS 4 (GARDES et BRUNS, 1993). La deuxième *PCR*, quant à elle, utilise des amorces spécifiques : Oasco F et Oasco R qui ont

déjà été définies pour amplifier les régions ITS chez *Erysiphe* (MOUGOU-HAMDANE et al., 2008).

Pour la première phase de la *nested PCR*, 1 à 10 ng d'ADN sont ajoutés dans une solution contenant les réactifs indiqués dans le Tableau 2. La *PCR* est réalisée sur un thermocycleur (Verti 96 Well Thermal Cyler Applied Biosystems) avec les paramètres suivants : une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min, une série de 30 cycles de dénaturation à 94°C pendant 45 secondes, suivie d'une hybridation (des amorces avec l'ADN) à 55°C pendant 45 secondes, puis une élongation pendant 1 minute et 10 secondes à 72°C. Les 30 cycles sont suivis d'une élongation finale à 72°C pendant 7 min. Les produits de la *PCR* sont visualisés sur un gel à 2% d'agarose contenant du GelRed[®], un colorant de l'ADN.

Les produits de la *PCR* sont ensuite dilués par 100 afin d'atténuer les effets des inhibiteurs et vont être à nouveau amplifiés au cours de la seconde *PCR* (Oasco F/R). (Tableau 3)

Tableau 3 — Proportion des réactifs de la *nested PCR*.

Réactifs <i>PCR</i>	Concentration initiale	Concentration finale	Unité	Volume par puits (µL)
Eau				10,295
Tampon (Invitrogen [®])	1X	10X		1,5
MgCl ₂	50	1,5	mM	0,45
dNTPs	40	5	mM	0,6
Amorce <i>forward</i>	10	0,2	µM	0,3
Amorce <i>reverse</i>	10	0,2	µM	0,3
Taq polymérase (Invitrogen [®])	0,15 X	0,15 X		0,0525
ADN	3-30	3-30	ng	1,5
Volume total				15

Les paramètres de la *PCR* sont les mêmes que pour la première *PCR*, excepté que les cycles d'hybridation de l'ADN sont au nombre de 40. Comme pour la première phase de la *nested PCR*, les produits sont visualisés sur un gel à 2% d'agarose contenant du GelRed[®].

2.2.2. Détection de matériel fongique dans les bourgeons par l'utilisation de la *PCR*

Dans l'optique de traiter un maximum de bourgeons, l'expérience est réalisée sur des groupes de bourgeons : une *PCR* pour un groupe de cinq quarts de bourgeon. Sachant que le nombre a été fixé à 1 000 bourgeons, 200 mélanges de bourgeons seront réalisés. Si, suite à la *PCR*, un groupe se révèle contenir de l'oïdium, la détection sera affinée afin de déterminer sur quel(s) bourgeon(s) précisément, le mycélium est présent grâce au quart de bourgeon conservé préalablement au réfrigérateur dans le but d'une seconde *PCR*.

2.2.2.1. Matériel végétal

Les bourgeons utilisés pour l'expérience sont issus de tiges de chênes récoltées dans la forêt domaniale de la Ferté (71) en mars 2010 par un correspondant-observateur du DSF. Les tiges ont

été conservées à 4°C en attendant que les bourgeons soient prélevés sur ces dernières afin d'éviter leur débourrement.

Le nombre de bourgeons à prélever a été déterminé en fonction du taux de présence de pousses drapeaux sur la forêt relevé lors d'une enquête du DSF effectuée en 2008 (Annexe 6). Ce nombre a été fixé à 1 000 bourgeons.

La forêt domaniale de la Ferté a été choisie pour le prélèvement car les résultats de l'enquête 2009 de suivi des pousses drapeaux par le DSF ont révélé (71) que, sur cette forêt, 100 % du symptôme commun (mycélium diffus) correspondait à *E. quercicola*.

2.2.2.2. Préparation préliminaire : découpage des bourgeons

La découpe s'effectue sous une loupe binoculaire éclairée sous un grossissement par dix. La désinfection du matériel est importante : la planche de découpe est désinfectée à l'éthanol tous les cinq bourgeons (équivalent à désinfecter la planche une fois qu'un groupe de cinq quarts de bourgeons est constitué) ; le scalpel (lame N°11) et la pince utilisés sont désinfectés (éthanol + flamme) pour chaque bourgeon.

Les bourgeons sont découpés en deux :

- une moitié est conservée au froid à 4°C dans l'optique d'une observation potentielle au microscope si de l'ADN de mycélium est détecté par *PCR*.
- l'autre moitié est découpée en deux. Une moitié sera utilisée pour la détection d'ADN de mycélium par *PCR*. L'autre moitié est conservée au froid, à - 20°C, dans l'optique d'une seconde *PCR*.

Les informations suivantes sont également notées :

- la tige sur laquelle a été prélevé le bourgeon,
- la position du bourgeon sur la tige (bas, milieu, haut)
- le type de bourgeon : axillaire ou terminal.
- l'ordre de ramification : 1, 2, 3 ...

Lors de la découpe, un numéro est attribué à chaque échantillon constitué du numéro de la tige sur lequel le bourgeon a été prélevé ainsi que le numéro du bourgeon. Par exemple : Le 357^{ème} bourgeon prélevé sur la tige n°36 porte le numéro T36B357

Les quarts de bourgeons qui sont utilisés pour la *PCR* N°1 sont regroupés par 5 dans les puits d'une plaque à extraction d'ADN (plaque contenant 12 barrettes de 8 puits soit 96 puits). Les quarts de bourgeons destinés à une éventuelle seconde *PCR* et les moitiés de bourgeons sont stockés provisoirement dans des plaques de type Elisa.

2.2.2.3. Première étape : détection par groupes

Cette phase a pour but d'essayer de détecter de l'ADN d'oïdium dans les groupes de cinq quarts de bourgeons préparés préalablement.

2.2.2.3.1. Extraction d'ADN à l'aide du Kit NucleoSpin®

Suite aux résultats obtenus lors du test préliminaire, l'extraction d'ADN est réalisée au moyen du kit NucleoSpin®. Le mode opératoire pour cette extraction a été présenté dans la partie 2.2.1.3.

2.2.2.3.2. Amplification de l'ADN par nested PCR

La *nested PCR* réalisée sur l'ADN précédemment extrait sur les groupes de bourgeons suit le même mode opératoire que celle présentée dans la partie 2.2.1.4.

2.2.2.3.3. Identification des lignées par digestion enzymatique de l'ADN amplifié

Afin de déterminer avec précision quel taxon d'*Erysiphe* est présent dans les bourgeons (*E. alphitoides*, *E. hypophylla*, *E. quercicola*), la méthode *CAPS* (*Cleaved amplified polymorphic sequence*) est utilisée. Cette technique distingue les séquences d'ADN amplifiées en effectuant des digestions enzymatiques sur des polymorphismes précis retrouvés sur ces séquences. Dans le cas qui nous intéresse, ces polymorphismes sont retrouvés sur les régions *ITS* et sont spécifiques des trois lignées *E. alphitoides*, *E. quercicola* et *E. hypophylla*. Les trois enzymes de restriction suivantes sont utilisées : *PvuII*, *BSR-I* et *BSMA-I* (Biolabs, Nouvelle-Angleterre) (Fig. 10).

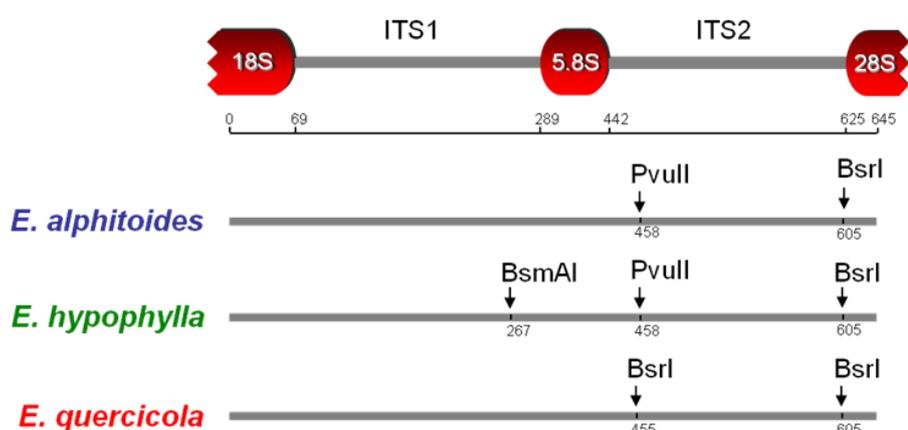


Figure 10 — Zone de restriction des régions ITS par les enzymes *PvuII*, *BSR I* et *BSMA I*. Le chiffre indiqué en dessous de la zone de restriction correspond à la taille du fragment d'ADN après la digestion.

Tableau 4 — Proportion des réactifs de la digestion enzymatique.

Composants digestion	Volume par puits (µL)
Eau	4,8
Tampon	1
Enzyme de restriction	0,2
Produits de <i>PCR</i>	4
Volume total	10

Dans notre situation, la méthode *CAPS* est appliquée directement à partir de la deuxième phase de la *nested PCR*. En effet, les produits de la *PCR* issus de cette dernière sont digérés dans une solution constituée des réactifs indiqués dans le Tableau 4. La réaction est réalisée pendant une heure à 37°C pour l'enzyme *PvuII*, à 65°C pour l'enzyme *BSR-I*, et à 55°C pour l'enzyme *BSMA-I*. Les produits de digestion sont visualisés sur un gel à 2 % d'agarose par électrophorèse contenant du GelRED®. Afin de différencier chaque fragment, un marqueur d'ADN de 1Kb est ajouté pour comparer la taille des fragments obtenus après digestion.

2.2.2.3.4. Séquençage des échantillons positifs

Un séquençage est réalisé sur les échantillons qui révéleront contenir de l'oïdium suite à la *nested PCR* et à la digestion enzymatique afin de confirmer et d'appuyer ses résultats.

2.2.2.3.4.1. Obtention des séquences

Les amplifications par *PCR* des régions ITS obtenues pour ces échantillons ont été séquencées dans les deux sens au moyen du kit de réaction *ABI Prism Bigdye Terminator Cycle Sequencing Ready*. Les produits de ces réactions de séquence ont été lues sur un séquenceur automatique de type ABI 3730 disponible sur la plateforme Génome-Transcriptome de l'INRA de Bordeaux (http://www.pierroton.inra.fr/biogeoco/site_pole_agro/genoseq.html).

2.2.2.3.4.2. Analyse des séquences

Après l'obtention des séquences, celles-ci sont nettoyées et assemblées grâce à l'utilisation du logiciel SeQual (GARNIER-GÉRÉ, en préparation) avant d'être alignées avec le logiciel ClustalW. Une recherche d'homologie de séquences (algorithme Blastn) pour ces séquences alignées est ensuite réalisée sur le serveur du NCBI (National center for biotechnology information ; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Cette recherche permet de trouver les séquences les plus homologues aux séquences des échantillons qui contiendraient de l'oïdium et ainsi appuyer ou non les résultats obtenus suite à la *nested PCR* et à la digestion enzymatique.

Pour chaque séquence étudiée, les dix premières séquences les plus proches retrouvées suite à la recherche avec l'algorithme Blastn sont récupérées et alignées avec la séquence étudiée grâce à l'algorithme ClustalW (THOMSON et al., 1994). L'alignement obtenu est vérifié manuellement puis sert de support à la reconstruction d'un arbre phylogénétique. Cet arbre est reconstruit en se basant sur une matrice de distance entre paires de séquences (distance dite de *Kimura-2-Parameters*) au moyen de la méthode de *Neighbor-Joining (NJ)*. Le serveur *Phylogeny.fr* (DEREEPER et al. 2008 ; <http://www.phylogeny.fr/>) a été utilisé pour effectuer cette reconstruction.

2.2.2.4. Deuxième étape : détection individuelle

Si de l'ADN d'oïdium est détecté dans un groupe de bourgeons, une détection individuelle est entreprise. Pour cela, les quarts de bourgeons conservés à -4°C dont le groupe a révélé contenir de l'oïdium sont récupérés. Le même mode opératoire que pour la détection par groupe, est utilisé à savoir :

- Extraction d'ADN avec le kit NucleoSpin[®],
- Amplification de l'ADN par *nested PCR*,
- Digestion enzymatique des produits de la *nested PCR* (méthode *CAPS*) avec les enzymes de restriction BSR-I, PVU-II et BSMA-I.
- Séquençage des échantillons qui ont révélés contenir de l'oïdium.

2.2.3. Expérience de contrôle sur pousses drapeaux

L'objectif de cette expérience est de contrôler des pousses drapeaux provenant de la Ferté (71) pour confirmer qu'*Erysiphe quercicola* est toujours bien à l'origine de ces pousses.

2.2.3.1. Matériel végétal

14 pousses-drapeaux provenant de la forêt domaniale de la Ferté ont été récoltées par un correspondant-observateur du DSF et réceptionnées en mai 2010.

2.2.3.2. Préparation préliminaire des échantillons.

Du mycélium ainsi que des conidies sont récupérés sur une à deux feuilles des pousses drapeaux à l'aide d'un scalpel (environ 0,5 cm²) et déposés dans des tubes « Eppendorf » de 2 mL. Au total, ce sont 14 tubes qui ont été préparés.

Les échantillons sont ensuite placés dans un congélateur à -80°C pendant au moins une heure avant d'être lyophilisés toute la nuit afin de supprimer toute l'eau qu'ils contiennent.

2.2.3.3. Extraction d'ADN sur feuilles au CTAB

L'extraction est réalisée suivant le protocole réalisé par ZOLAN et PUKKILA (1986) auquel certaines modifications ont été apportées. (Annexe 7). Une fois extrait, l'ADN est dilué dans 20 µL de tampon d'élution d'ADN (tampon issu du kit NucleoSpin[®]) et sera utilisé pour la *PCR*.

Suite à l'extraction, l'ADN est dosé et quantifié pour vérifier sa qualité puis révélé sur un gel à 0,8% d'agarose par électrophorèse pour contrôler la présence ou non de l'ADN.

Les échantillons sont ensuite conservés à -20°C avant leur amplification par *PCR*

2.2.3.4. Amplification de l'ADN grâce à une *PCR* spécifique

Cette *PCR* spécifique est réalisée avec les amorces Oasco F et Oasco R. La réaction s'effectue avec les mêmes réactifs que pour la seconde *PCR* de la *nested PCR* réalisée auparavant (cf. paragraphe 2.2.1.4) excepté que le volume réactionnel est doublé : 30 µL au lieu de 15. Les produits de la *PCR* sont ensuite visualisés sur un gel à 2% d'agarose contenant du GelRed.

2.2.3.5. Identification des lignées par digestion enzymatique de l'ADN amplifié

Le mode opératoire de cette digestion est identique à celui présenté dans le paragraphe 2.2.2.3.3.

3. Résultats

3.1. Débourrement de tiges de chênes en milieu contrôlé

Cette expérience avait pour but de démontrer si du matériel fongique correspondant à de l'oïdium des chênes hiberne dans les bourgeons de chênes en dormance.

3.1.1. Test préliminaire

L'objectif de ce test était de savoir quel type de matériel végétal (plant avec racines ou tige coupée à la base) présente une vitesse et un taux de débourrement les plus élevés.

Tableau 5 — Résultats de la comparaison du débourrement entre les types de matériel végétal « plant avec racines » et « tige coupée à la base ». Le stade phénologique correspond à une période précise de développement de la plante. Le stade 7 équivaut à l'éclosion du bourgeon.

	Effectif par stade phénologique à la fin de l'expérience				Nombre d'individus débourrés / total
	Stade 1	Stade 7	Stade 9	Stade 10	
Tiges	2	6	1	1	8 / 10
Plants	5	3	2	0	5 / 10

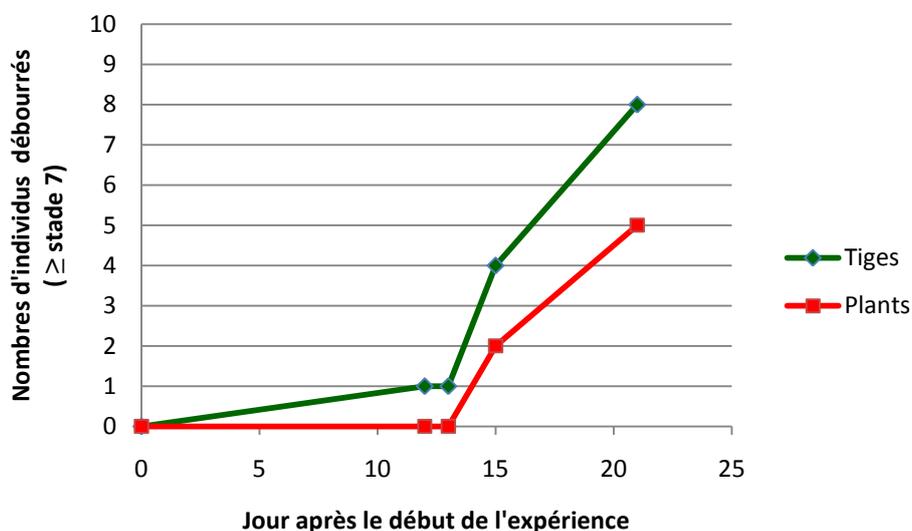


Figure 11 — Evolution au cours de l'expérience test du nombre d'individus débourrés entre les types de matériel végétal « plant avec racines » et « tige coupée à la base ».

Le débourrement est considéré comme acquis lorsque le bourgeon est au stade 7 de l'échelle phénologique du chêne sessile (SECONDAT, 2008 ; MEIER 2001) ce qui correspond au début de l'éclatement des bourgeons et au développement des pousses : les extrémités des feuilles vertes deviennent visibles. A noter qu'une tige ou un plant est considéré débourré dès lors qu'il y a au moins un bourgeon qui a atteint le stade 7. Au bout de 21 jours, après la mise en place de l'expérience, huit tiges sont comprises entre les stades 7 et 10, et cinq plants sont compris entre les

stades 7 et 9 (Tableau 5). Du point de vue du développement des feuilles, il y a un peu moins d'échantillons débourrés pour les plants mais pour ces derniers, les feuilles sont plus développées (longueur maximum 2,5 cm) que pour les tiges (longueur maximum : 1,5 cm). Avec près de 80 %, les tiges présentent le meilleur taux de débourrement. De plus, leur débourrement a commencé plus tôt que pour les plants (Fig. 11). Par conséquent l'expérience qui va suivre sur le débourrement sera réalisée avec des tiges de chênes et non pas des plants, malgré un meilleur développement foliaire pour ces derniers.

Par ailleurs, l'expérience test a été prolongée dans le temps pour les tiges, afin de déterminer combien de temps elles pouvaient demeurer viables dans nos conditions expérimentales. Au bout de 14 jours après les premiers débournements, les tiges ont atteint leur limite en termes de survie : les feuilles se flétrissent et se dessèchent (observés pour 70 % des tiges à cette date).

3.1.2. Expérience sur le débourrement

Suite aux résultats obtenus sur le taux de débourrement lors de l'expérience test et en tenant compte du taux de présence de pousses drapeaux sur la forêt du Gâvre (taux moyen de 2,18 % ; Mickaël RICORDEL et Dominique PIOU, communication personnelle) le nombre d'échantillons à prélever sur le terrain a pu être déterminé. Une marge de sécurité a été prise en compte pour ces deux taux pour ne pas sous-estimer l'échantillonnage. De ce fait, le nombre d'échantillons à prélever est une moyenne des nombres d'échantillons calculés en fonction de la marge du taux de débourrement (comprise entre 50 et 80 %) et du taux de présence de pousses drapeaux (compris entre 1 % et 2,5 %). Ainsi le nombre de prélèvements a été établi à 200 individus. (Annexe 2).

Les tiges ont été contrôlées régulièrement pendant l'expérience et cinq comptages du nombre de tiges débourrées ont été réalisés durant l'expérience. Au total, 107 individus (50,5 %) ont débourré sur les 212 tiges de notre expérimentation. Lors d'un comptage à t + 43 jours après la mise en place de l'expérience, un bourgeon au stade 10 de l'échelle phénologique du chêne sessile (SECONDAT, 2008 ; MEIER 2001) totalement blanc a été observé, indiquant la présence de mycélium et donc la présence d'une pousse drapeau (Fig.12 a). Cette pousse drapeau correspondait à un bourgeon axillaire localisé sur le milieu de l'axe principal de la tige. A noter que cette pousse drapeau est différente des pousses drapeaux observées habituellement sur le terrain (Fig. 12).

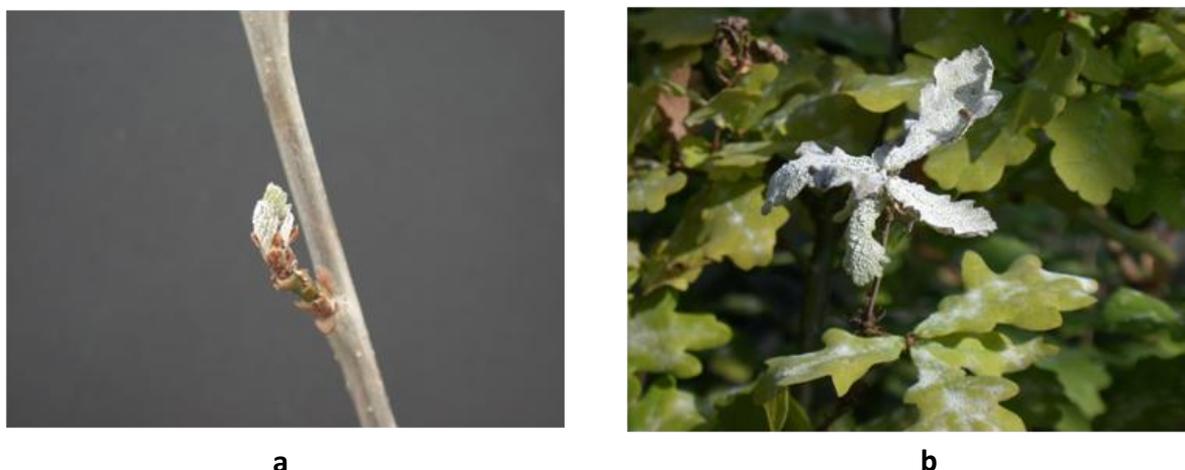


Figure 12 — Pousses drapeaux observées dans deux milieux différents. (a) Pousse drapeau provenant d'un bourgeon axillaire de la tige numéroté « 7D6 » de l'expérience de débourrement en milieu contrôlé. (b) Pousse drapeau observée sur une régénération de chênes.

Une extraction d'ADN effectuée à partir de mycélium prélevé sur cette pousse drapeau suivie d'une amplification de l'ADN extrait avec les amorces spécifiques « oïdium » Oasco R / Oasco F et de digestions enzymatiques avec les enzymes BSR-I, BSMA-I et PVU-II a permis d'obtenir un profil de digestion similaire à celui de *E. quercicola*.

3.2. Expérience sur la détection de matériel fongique dans les bourgeons

Le but de cette expérience était de confirmer ou non la présence de matériel fongique d'oïdium dans les bourgeons de chêne grâce à un diagnostic établi avec la technique de *PCR* complétée par la méthode *CAPS*. Ce diagnostic a été confirmé dans certains cas par un séquençage des produits *PCR* obtenus. Un test préliminaire avait été réalisé afin de i. tester deux kits d'extraction d'ADN et ii. déterminer les quantités de matériel fongique à partir desquelles l'oïdium devient détectable dans les bourgeons avec ces techniques de biologie moléculaire.

3.2.1. Test préliminaire

La migration de l'ADN effectuée sur un gel à 0,8 % d'agarose a permis de mettre en évidence la présence de quantités satisfaisantes d'ADN pour l'ensemble des échantillons (Annexe 8). Du point de vue du dosage, le kit Invisorb® est plus performant que le kit NucleoSpin® puisque en moyenne, la quantité d'ADN obtenue est supérieure (Fig. 13a). A noter toutefois que l'amplitude des quantités d'ADN obtenues avec le kit Invisorb® sont plus importantes que celles obtenues avec le kit NucleoSpin®. Du point de vue de la qualité d'ADN, il n'y a pas de différences notables entre les deux kits (p -value > 0,05) (Fig. 13b). Une bonne qualité d'ADN équivaut à un ratio compris entre 1,8 et 2, valeurs entre lesquelles la majeure partie des échantillons extraits avec le kit Invisorb® est comprise. Le kit NucleoSpin® présente également une bonne qualité d'ADN mais l'amplitude du rapport des densités chromatiques est plus importante que pour le kit Invisorb®. Par conséquent, le kit Invisorb® semble plus performant que le kit NucleoSpin® que ce soit au niveau de la quantité d'ADN extraite qu'au niveau de sa qualité.

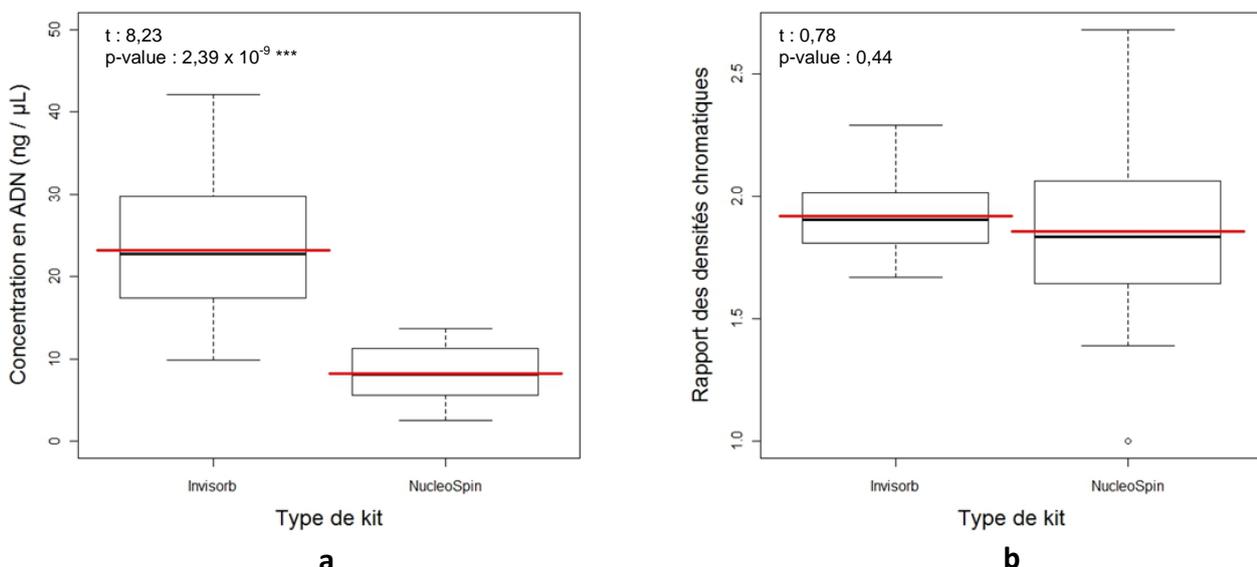


Figure 13 — Comparaison du rendement des kits Invisorb® et NucleoSpin®. (a) Comparaison des concentrations en ADN. (b) Comparaison des rapports des densités chromatiques (260/280 nm). La significativité des effets des facteurs est matérialisée par un astérisque (*) pour le niveau 0,05, () pour le niveau 0,01 et (***) pour le niveau 0,001. La moyenne est représentée par un trait horizontal rouge. Le côté supérieur de la boîte correspond au troisième quartile et le côté inférieur au premier quartile. Chaque boîte est coupée par sa médiane (trait noir). Les segments situés au dessus et en dessous de chaque boîte correspondent aux valeurs extrêmes supérieures et inférieures, respectivement. Les valeurs aberrantes sont matérialisées par des cercles vides.**

Tableau 6 — Résultats de la nested PCR pour les kits Invisorb® et NucleoSpin®.

	nested PCR phase 1		nested PCR phase 2	
	kit Invisorb®	kit NucleoSpin®	kit Invisorb®	kit NucleoSpin®
Série 1	1	1	3	1
Série 2	1	2	1	2
Série 3	4	6	2	6
Nombre d'échantillons amplifiés / total	6 / 18	9 / 18	6 / 18	9 / 18
Rendement PCR (en %)	33.3	50	33.3	50

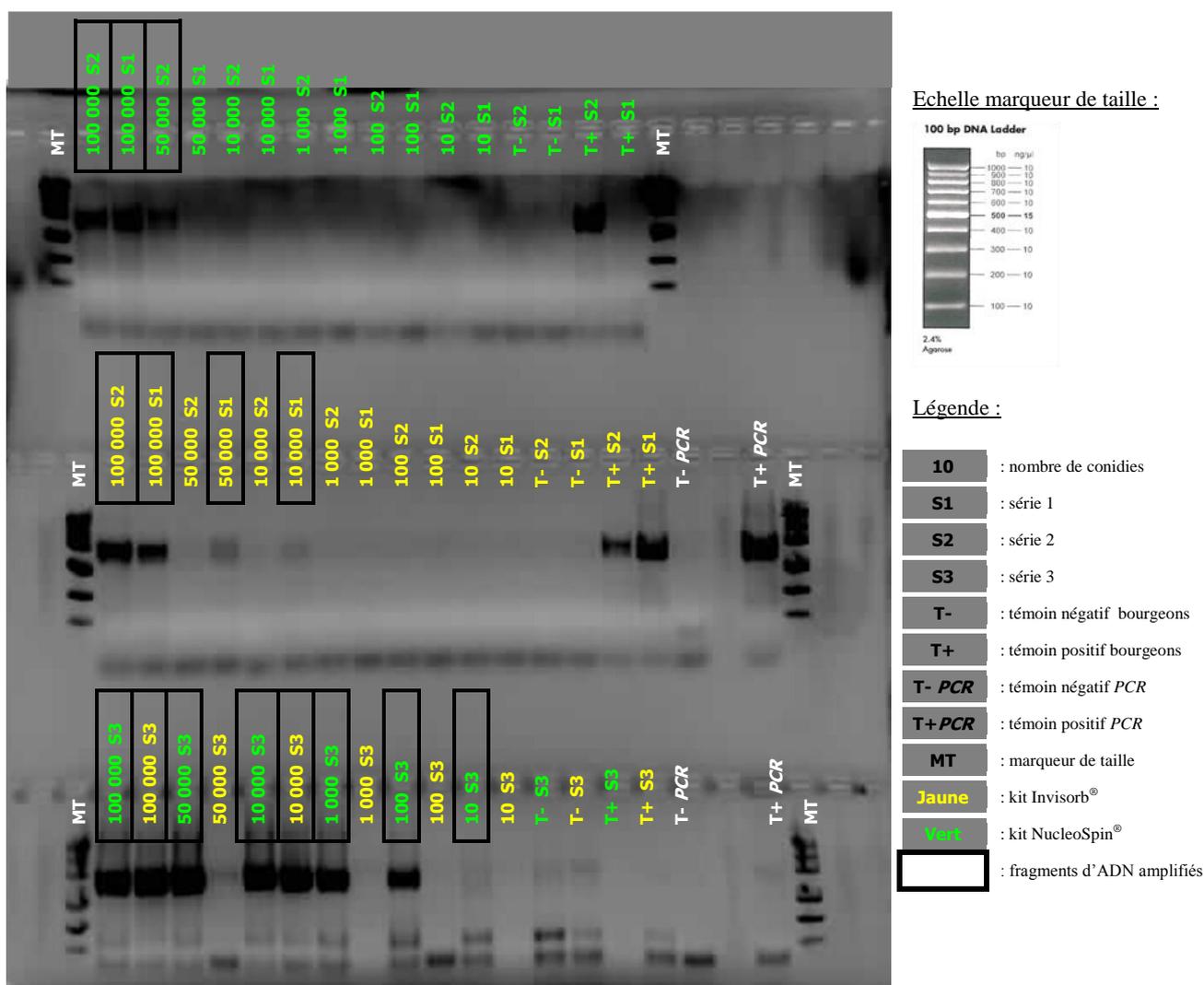


Figure 14 — Produits PCR obtenus pour la seconde phase de la nested PCR pour les kits Invisorb® et NucleoSpin®.

L'ADN obtenu avec les deux kits d'extractions a été amplifié au moyen de la technique de *nested PCR*. Une première phase d'amplification avec des amorces universelles (ITS 1F / ITS 4) permet d'amplifier les régions ITS pour le mélange d'ADN chêne (bourgeon) – champignon. La seconde phase d'amplification, beaucoup plus sélective ne cible que les régions ITS de l'oïdium (amorces Oasco F / Oasco R) parmi celles amplifiées avec la première PCR. Entre six et neuf produits PCR ont pu être obtenus selon le kit d'extraction (Tableau 6).

Que ce soit aussi bien pour la phase 1 de la *nested PCR* ou pour la phase 2, le kit NucleoSpin® présente un rendement d'amplifications supérieur au kit Invisorb® (Tableau 6). De plus, le kit NucleoSpin® permet d'obtenir une sensibilité *PCR* plus grande que l'autre kit. En effet, il permet d'obtenir une détection de l'oïdium pour des quantités de conidies allant de 100 000 à 10 alors que le kit Invisorb® reste limité aux valeurs inférieures à 10 000 conidies (Fig. 14).

Suite à ces résultats et malgré le fait que l'extraction d'ADN soit globalement moins performante que pour le kit Invisorb®, le kit NucleoSpin® apparaît être plus intéressant. Il sera donc utilisé pour les extractions de l'expérience de détection de matériel fongique dans les bourgeons.

3.2.2. Détection de matériel fongique dans les bourgeons par l'utilisation de la *nested PCR*

Pour cette expérience, 473 bourgeons ont été découpés ce qui représentent 94 groupes de bourgeons (91 groupes de cinq quarts de bourgeons et trois groupes de six quarts de bourgeons).

3.2.2.1. Détection par groupes de bourgeons

La migration des produits de l'extraction avec le kit NucleoSpin® sur un gel à 0,8 % d'agarose par électrophorèse a révélé la présence d'ADN pour la plupart des groupes de bourgeons (Fig. 15a). La quantité d'ADN extraite est faible et se situe pour l'ensemble entre 2 et 7 ng / μ L. De plus, il existe des valeurs très extrêmes (supérieur à 30 ng / μ L). La qualité de l'ADN est, quant à elle, très moyenne : les rapports des densités chromatiques se situent autour d'une moyenne de 1,5 (Fig. 15b). Ces résultats peuvent paraître médiocres mais l'expérience test a montré que des résultats satisfaisants en termes d'amplification par *PCR* avaient été obtenus avec ce kit d'extraction d'ADN ce malgré des rendements d'extraction d'ADN moyen (cf. paragraphe 3.2.1).

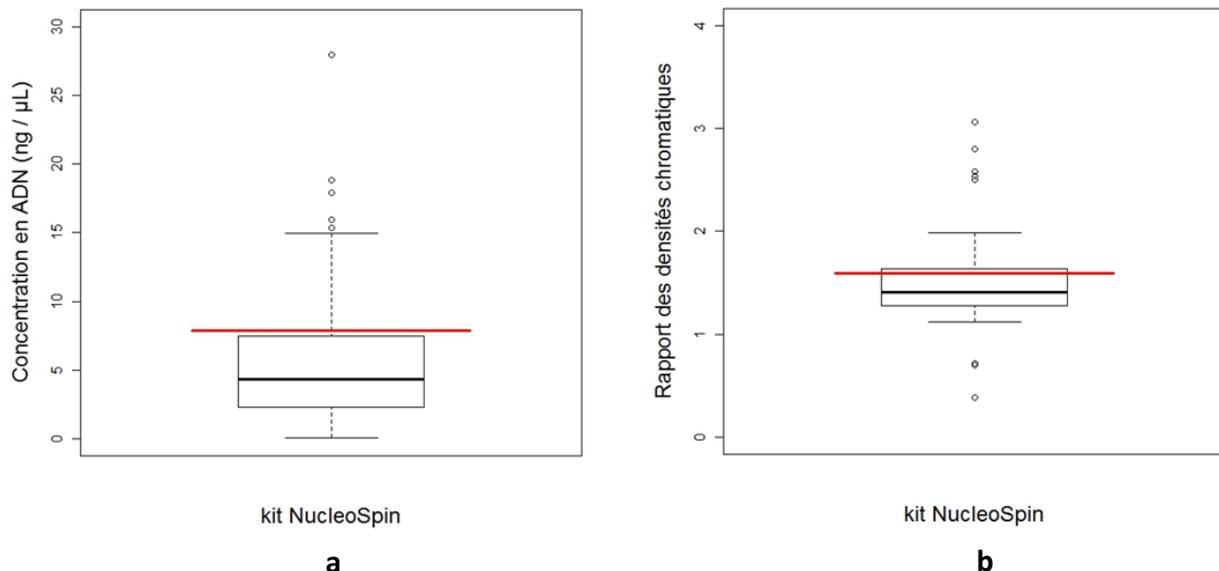


Figure 15 — Résultats de l'extraction d'ADN sur les groupes de bourgeons. (a) Concentration en ADN. (b) Rapports des densités chromatiques (260/280 nm). La moyenne est représentée par un trait horizontal rouge. Le côté supérieur de la boîte correspond au troisième quartile et le côté inférieur au premier quartile. Chaque boîte est coupée par sa médiane (trait noir). Les segments situés au dessus et au dessous de chaque boîte correspondent aux valeurs extrêmes supérieures et inférieures, respectivement. Les valeurs aberrantes sont matérialisées par des cercles vides.

Lors de la première phase de la *nested PCR*, 19 fragments d'ADN ont été amplifiés avec les amorces ITS 1F / ITS 4 et 23 lors de la seconde phase avec les amorces Oasco F / Oasco R (Tableau 7). La taille de ces derniers correspond à la taille de 645 bp attendue pour l'oïdium. A noter qu'aucun fragment d'ADN n'a été obtenu pour les témoins négatifs de *PCR*. La digestion enzymatique avec les enzymes de restriction PVU-II, BSR-I et BSMA-I a permis d'obtenir, à partir des produits de la *nested PCR*, des profils de digestion correspondant aux espèces *E. quercicola* (1 fragment) et *E. alphitoides* (21 fragments) (Tableau 8).

Tableau 7 — Résultats de la *nested PCR* effectuée sur l'ADN extrait à partir des groupes de bourgeons.

	<i>nested PCR</i> phase 1	<i>nested PCR</i> phase 2
Nombre d'échantillons amplifiés / total	19 / 93	23 / 93
Rendement <i>PCR</i> (en %)	20,4	24.7

Tableau 8 — Résultats de la digestion enzymatique sur les groupes de bourgeons.

Enzymes de restriction	PVU-II	BSR-I	BSMA-I	Echantillons non digérés
Nombres d'échantillons digérés	21	1	0	1

La *nested PCR* accompagnée de la méthode *CAPS* – digestion enzymatique – a ainsi permis de détecter la présence d'un groupe de bourgeons contenant de l'ADN correspondant à celui d'*E. quercicola*. Nous avons confirmé ce résultat en séquençant le groupe concerné et sept autres identifiés comme étant de l'*E. alphitoides*. Huit séquences ITS complètes ont ainsi pu être obtenues.

La recherche de séquences homologues sur le site NCBI a permis de mettre en évidence que les sept échantillons qui présentaient un profil *CAPS* correspondant à *E. alphitoides* concordent quasi parfaitement avec les séquences homologues de la même espèce (Tableau 9). Quant à la séquence du groupe qui révélait contenir *E. quercicola* (A10), celle-ci concorde bien avec la séquence d'*Oïdium heveae* en sachant que les espèces *Erysiphe quercicola* et *Oïdium heveae* ont des régions ITS strictement identiques (TAKAMATSU et al., 2007). L'arbre phylogénétique, présenté dans la figure 16, montre bien la faible distance génétique qu'il existe entre l'échantillon A10 et le clade *E. quercicola*, de même que pour les sept autres échantillons et le clade *Erysiphe alphitoides*.

En définitif, la détection par groupe de bourgeons a permis de déceler *E. quercicola* dans un groupe de bourgeons ainsi que, contre toute attente, *E. alphitoides* dans 21 autres groupes. La seconde étape de détection va permettre de définir avec précision quel bourgeon contient du matériel fongique rattaché à l'oïdium.

Tableau 9 — Résultats des recherches d'homologues obtenus (base de donnée de séquences du NCBI) pour les huit séquences ITS obtenues à partir d'ADN extraits sur des groupes de bourgeons. Un seul résultat d'homologie (le meilleur) est présenté pour chaque séquence ITS.

Nom de la séquence ITS	Code	Espèce	Couverture nucléotidique (en %)	Homologie (en %)
A10	EU285551.1	<i>Oidium heveae</i>	84	99
C10	AB292710.1	<i>Erysiphe alphitoides</i>	100	100
E10	AB292710.1	<i>Erysiphe alphitoides</i>	100	100
G10	AB292710.1	<i>Erysiphe alphitoides</i>	100	100
E11	AB292710.1	<i>Erysiphe alphitoides</i>	93	99
F11	AB292710.1	<i>Erysiphe alphitoides</i>	94	99
G11	AB292710.1	<i>Erysiphe alphitoides</i>	100	100
A12	AB292710.1	<i>Erysiphe alphitoides</i>	100	100

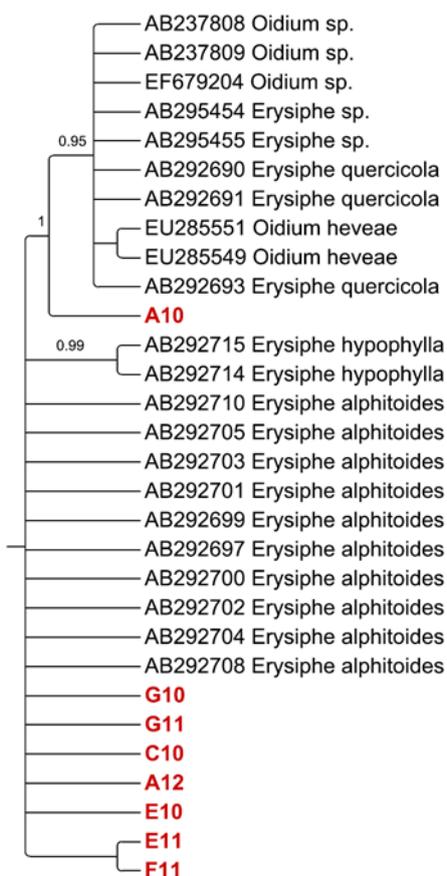


Figure 16 — Arbre phylogénétique reconstruit à partir de la méthode de Neighbor-Joining sur une matrice de distance K2P entre paires de séquences obtenues pour les groupes de bourgeons positifs (en rouge) et des dix séquences homologues les plus proches (en noir) retrouvées dans la base de données du NCBI. Pour ces séquences, les noms des espèces sont précédées par l'identifiant (numéro d'accession) déposé dans la base de donnée. Deux séquences de la troisième espèce du complexe, *Erysiphe hypophylla* ont été ajoutées en plus dans l'arbre.

3.2.2.2. Détection individuelle

Pour cette seconde phase, une nouvelle extraction a été réalisée sur 121 bourgeons issus des 23 groupes dans lesquels l'oïdium a été décelé avec succès lors de l'expérience précédente (groupe de bourgeons), plus un groupe pour lequel la présence d'oïdium était mise en doute suite à une amplification avec les amorces Oasco F/Oasco R peu nette. Les résultats obtenus pour cette seconde extraction sont moins satisfaisant que ceux obtenus pour la première phase : la quantité d'ADN extraite est plus faible et sa qualité est très moyenne (Fig. 17). Cependant, l'expérience test et la première phase de l'expérience de détection ont dévoilé des résultats satisfaisants en termes d'amplification par PCR suite à l'extraction d'ADN avec le kit NucleoSpin® (cf. paragraphe 3.2.1 et 3.2.2.1)

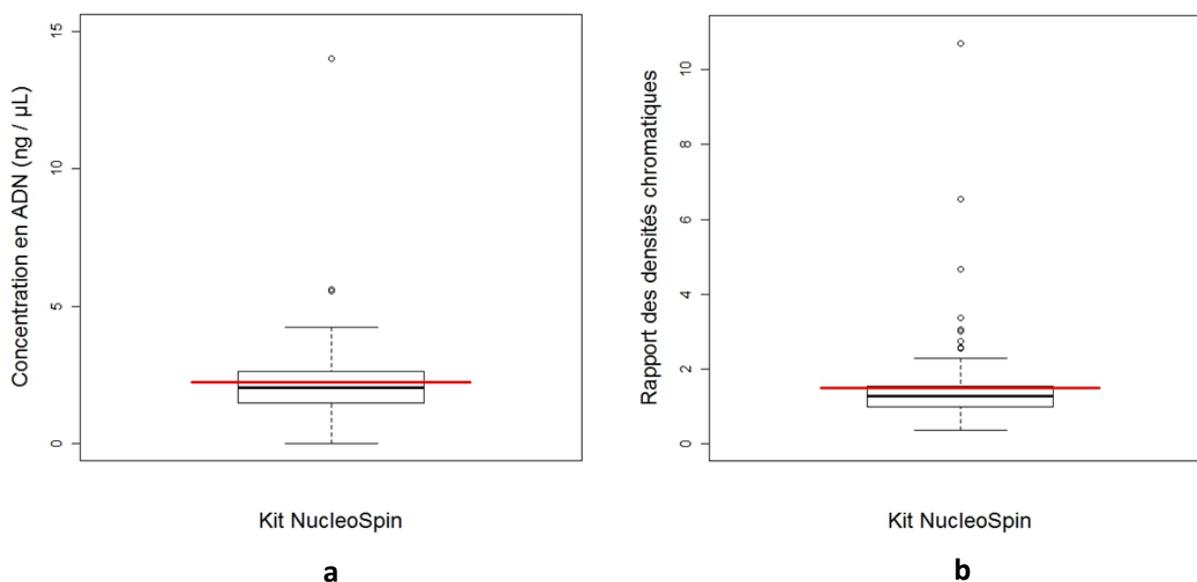


Figure 17 — Résultats de l'extraction d'ADN sur les bourgeons individuels. (a) Concentration en ADN. (b) Rapports des densités chromatiques (260/280 nm). La moyenne est représentée par un trait horizontal rouge. Le côté supérieur de la boîte correspond au troisième quartile et le côté inférieur au premier quartile. Chaque boîte est coupée par sa médiane (trait noir). Les segments situés au dessus et au dessous de chaque boîte correspondent aux valeurs extrêmes supérieures et inférieures, respectivement. Les valeurs aberrantes sont matérialisées par des cercles vides.

Tableau 10 — Résultats de la *nested PCR* effectuée sur l'ADN extrait à partir des bourgeons individuels.

	<i>nested PCR</i> phase 1	<i>nested PCR</i> phase 2
Nombre d'échantillons amplifiés / total	90 / 121	6 / 121
Rendement PCR (en %)	74,4	4,95

Tableau 11 — Résultats de la digestion enzymatique sur les bourgeons individuels.

Enzymes de restriction	PVU II	BSR I	BSMA I	Echantillons non digérés
Nombres d'échantillons digérés	5	2	0	0

La *nested PCR* réalisée avec les amorces universelles puis les amorces spécifiques a permis d'amplifier six fragments d'ADN de la taille espérée pour l'oïdium (645 bp) parmi les 121

bourgeons (Tableau 10). De plus, aucun fragment amplifié n'était présent pour les témoins négatifs de *PCR*. La digestion enzymatique, qui vient compléter cette *PCR*, appuie les résultats obtenus sur ces six fragments (Tableau 11). Le profil de digestion correspondant à *E. quercicola* a été identifié dans un bourgeon provenant du groupe dans lequel *E. quercicola* avait été détecté lors de la première étape de la détection. Le profil correspondant à *E. alphitoides* a été identifié sur quatre bourgeons provenant de groupes dans lesquels le taxon avait été détecté. Enfin, les profils de digestion correspondant *E. quercicola* et *E. alphitoides* ont été détectés sur un bourgeon provenant d'un groupe sur lequel *E. alphitoides* avait été détecté. Le séquençage de ces six individus a confirmé ces résultats grâce à l'obtention de cinq séquences ITS complètes. La séquence ITS d'un individu identifié comme étant de l'*E. alphitoides* était inexploitable (séquence incomplète).

A noter que, suite à l'obtention de faibles rendements de *PCR* avec le protocole initial, la seconde phase de la nested *PCR* a été réalisée une deuxième fois sur les produits non dilués de la première phase de la nested *PCR* pour une soixantaine de bourgeons. Le rendement obtenu pour cette nouvelle *PCR* est bien meilleur (75,4 %) mais les échantillons amplifiés présentent de nombreux fragments d'ADN qui n'apparaissent pas habituellement. De plus, les résultats de la digestion enzymatique réalisée sur ces fragments amplifiés ne sont pas clairs : les profils de digestion ne correspondent pas à ceux obtenus habituellement avec les trois enzymes de restriction (obtention de fragments de tailles diverses). Un séquençage sur huit de ces échantillons a permis de définir clairement si ces fragments appartenaient ou non à un taxon d'*Erysiphe*. Quatre séquences ITS ont ainsi été obtenues. Les séquences ITS des quatre autres individus étaient inexploitables (séquence incomplète). Afin d'avoir un aperçu de la diversité fongique qui peut être retrouvée dans les bourgeons de chêne en dormance, les résultats de ce séquençage sont présentés avec les résultats du séquençage des six bourgeons sur lesquels l'oïdium a été identifié précédemment.

Tableau 12 — Résultats des recherches d'homologues obtenus (base de donnée de séquences du NCBI) pour les neuf séquences ITS obtenues à partir d'ADN extraits sur des bourgeons. Un seul résultat d'homologie (le meilleur) est présenté pour chaque séquence ITS.

Individu	Code	Espèce	Couverture nucléotidique (en %)	Homologie (en %)
B25	AB292710.1	<i>Erysiphe alphitoides</i>	99	99
B41	EU285551.1	<i>Oïdium heveae</i>	81	99
B52	AB292710.1	<i>Erysiphe alphitoides</i>	91	99
B209	AB292710.1	<i>Erysiphe alphitoides</i>	98	100
B210	EU285551.1	<i>Oïdium heveae</i>	89	99
B253	EF394833.1	<i>Mycosphaerella elongata</i>	100	92
B256	GU214644.1	<i>Phaeophleospora atkinsonii</i>	83	94
B301	EF394833.1	<i>Mycosphaerella elongata</i>	84	93
B350	GU570541.1	<i>Microcyclospora tardicrescens</i>	93	85

La recherche de séquences homologues sur le site NCBI a permis de trouver neuf homologues aux neuf séquences ITS obtenues précédemment (Tableau 12). Les séquences des trois individus identifiés comme étant de l'*E. alphitoides* concordent avec celles provenant du site NCBI (homologie de 99 et 100 %) malgré le fait que le pourcentage de couverture nucléotidique n'est pas parfait pour certains individus (cas de B52). Les séquences des deux individus, dans lesquels *E.*

quercicola a été détecté, concordent avec la séquence d'*Oidium heveae* bien que là aussi, la couverture nucléotidique ne soit pas parfaite. Enfin les séquences des quatre individus dont l'espèce n'a pas été identifiée sont proches de séquences de trois champignons : *Microcyclospora tardicrescens*, *Mycosphaerella elongata* et *Phaeophleospora atkinsonii*. Le lien mis en évidence entre les séquences ITS des neuf individus étudiés et les séquences homologues est affiné grâce à un arbre phylogénétique (Fig. 18). Les échantillons B41 et B210 présentent, sans surprise, une faible distance génétique avec *E. quercicola*. De même que pour les échantillons B25, B52 et B209 qui présentent une faible distance génétique avec *E. alphitoides*. D'après nos données moléculaires, les individus B253, B256 et B301 seraient taxonomiquement proche des espèces *Phaeophleospora atkinsonii* et *Mycosphaerella elaeocarpi*. Enfin l'individu B350 se rapproche d'un champignon non cultivé et de *Teratosphaeria jonkershoekensis*.

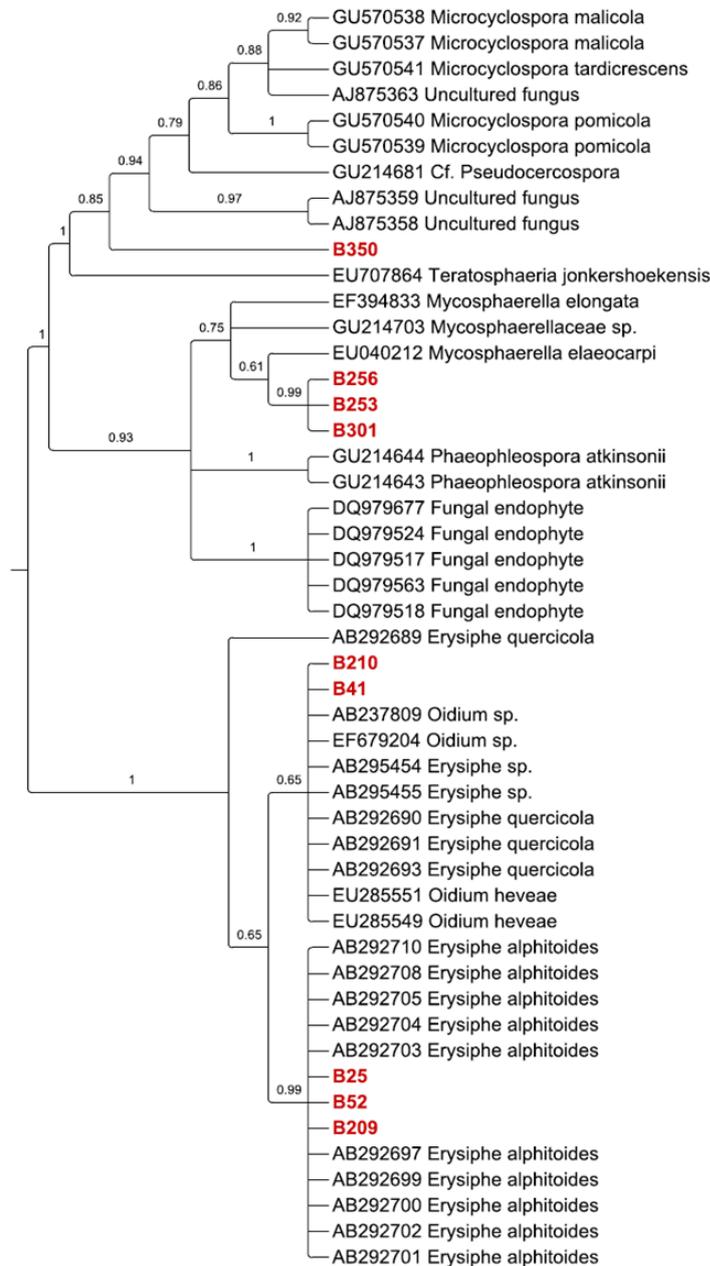


Figure 18 — Arbre phylogénétique reconstruit à partir de la méthode de Neighbor-Joining sur une matrice de distance K2P entre paires de séquences pour les bourgeons individuels positifs (en rouge) et des dix séquences les plus proches (en noir) retrouvées dans la base de données du NCBI. Pour ces séquences, les noms des espèces sont précédées par l'identifiant (numéro d'accession) déposé dans la base de donnée.

La seconde étape de l'expérience de détection dans les bourgeons de chênes de matériel fongique correspondant à l'oïdium a permis de mettre en évidence l'agent pathogène dans six bourgeons sur un total de 473, soit un taux de présence de l'oïdium de 1,3 % d'oïdium répartis de la manière suivante : 0,42 % étant de l'*E. quercicola* et 1,06 % contenant de l'*E. alphitoides*. Excepté pour un bourgeon, les bourgeons positifs sont du type axillaire et sont tous situés dans la partie supérieure des tiges (tableau 13). Enfin, l'ordre de l'axe est variable suivant les bourgeons.

Tableau 13 — Caractéristiques des bourgeons contenant du matériel fongique d'oïdium.

Individu	Espèce détecté	Séquences homologues	Localisation sur la tige de provenance		
			Hauteur	Type de bourgeons	Ordre de l'axe
B25	<i>E. alphitoides</i>	oui	haut	axillaire	1
B41	<i>E. quercicola</i>	oui	haut	terminal	2
B52	<i>E. alphitoides</i>	oui	haut	axillaire	2
B209	<i>E. alphitoides</i>	oui	haut	axillaire	2
B210	<i>E. quercicola</i> + (<i>E. alphitoides</i>)	oui	haut	axillaire	3
B415	<i>E. alphitoides</i>	non	haut	axillaire	1

3.2.3. Expérience de contrôle

Jusque là, seule l'espèce *E. quercicola* a été identifiée comme étant responsable des pousses drapeaux (FEAU et al., en préparation) or *E. alphitoides* a été détecté dans plusieurs bourgeons lors de notre expérience de détection de matériel fongique dans les bourgeons. Par conséquent, une expérience de contrôle a été réalisée sur des pousses drapeaux provenant de la Ferté afin de confirmer ou non que les pousses drapeaux sont dues à *E. quercicola*. Pour cela, une *PCR* spécifique avec les amorces Oasco F / Oasco R a été réalisée.

L'extraction d'ADN réalisée sur les quatorze échantillons a très bien fonctionné puisque la migration de l'ADN réalisée sur un gel d'électrophorèse à 0,8 % d'agarose a révélé la présence d'ADN. Le dosage de celui-ci indique qu'il est présent en quantité importante et que sa qualité est correcte étant donné que la moyenne des rapports des densités chromatiques est de 2,01 (Fig. 19). La *PCR* spécifique, réalisée ensuite, a permis d'amplifier cinq échantillons sur quatorze à partir de l'ADN extrait dilué par dix, soit un taux de réussite de 35,7 %. Enfin, lors de la digestion enzymatique, le profil de digestion *E. quercicola* a été identifié pour les fragments d'ADN des cinq individus.

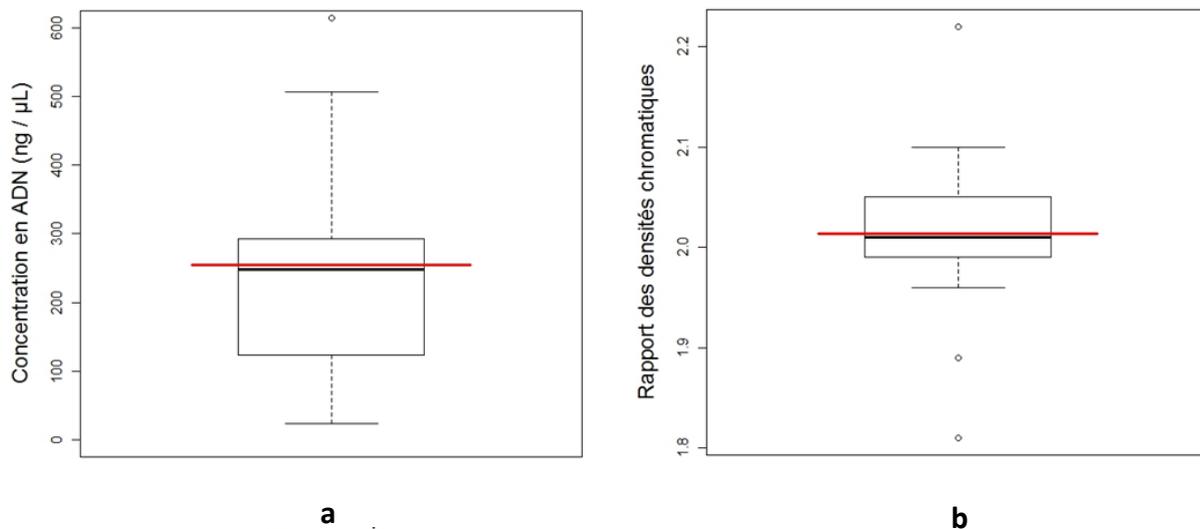


Figure 19 — Résultats de l'extraction d'ADN sur les échantillons de contrôle (a) Concentration en ADN ;(b) Rapports des densités chromatiques (260/280 nm). La moyenne est représentée par un trait horizontal rouge. Le côté supérieur de la boîte correspond au troisième quartile et le côté inférieur au premier quartile. Chaque boîte est coupée par sa médiane (trait noir). Les segments situés au dessus et au dessous de chaque boîte correspondent aux valeurs extrêmes supérieures et inférieures, respectivement. Les valeurs aberrantes sont matérialisées par des cercles vides.

4. Discussion

L'objectif de cette étude visait à vérifier si un mode de conservation hivernal d'*E. quercicola* dans les bourgeons de chênes en dormance sous la forme de matériel fongique (mycélium, conidies, chasmothèces...) est à l'origine des pousses drapeaux observées au cours du printemps. La mise en place de deux expériences complémentaires, à savoir : une expérience de débourrement de tiges en milieu contrôlé et une expérience de détection de matériel fongique dans des bourgeons avait pour but de confirmer cette hypothèse.

L'hypothèse d'une hibernation de l'oïdium dans les bourgeons de chênes sous la forme de matériel fongique avait déjà été émise auparavant par plusieurs auteurs, incluant en particulier KERLING (1966). En effet, cet auteur a cherché à déterminer à quelle période de la saison les bourgeons de chênes avaient une chance de devenir infectés par du matériel fongique. A la suite de son étude, il suppose que les pousses drapeaux proviennent de l'infection préalable de bourgeons de chênes dues à l'hibernation dans ceux-ci de matériel fongique sous deux formes possibles : soit des conidies qui contamineraient les bourgeons durant leur période de production abondante ayant lieu de juillet jusqu'à l'automne, soit par du mycélium qui viendrait se loger au niveau des feuilles primordiales (parties internes vertes) du bourgeon durant la même période. Seulement, KERLING (1966) émet des doutes sur ces hypothèses car l'installation de l'oïdium au sein des bourgeons ne concorde pas réellement avec les étapes du développement biologique des bourgeons : écailles du bourgeon fortement appliquées les unes contre les autres empêchant le passage des conidies ou du mycélium, écailles et parties internes trop brunes empêchant l'installation de mycélium. Cette hypothèse d'hibernation bien que non formellement démontrée, a été reprise par LANIER (1976) qui confirme l'hibernation dans les bourgeons et précise que le mycélium serait inséré entre les écailles des bourgeons.

La dualité des expériences mises en œuvre au cours de notre étude a permis de confirmer de deux façons distinctes, sur le terrain et au laboratoire, que l'oïdium hiberne bien dans les bourgeons de chênes puisque l'expérience de débourrement en milieu contrôlé a permis de mettre en évidence la présence d'une pousse drapeau, et l'expérience de détection de matériel fongique dans les bourgeons a permis de détecter *E. quercicola* dans six bourgeons de chênes. Ainsi, les résultats obtenus recoupent bien les résultats ou les hypothèses décrites auparavant dans la littérature scientifique. Cependant l'expérience de débourrement et l'expérience de détection présentent certaines limites qui vont être présentées ci-dessous.

Le débourrement en milieu contrôlé d'une pousse drapeau suggère bien l'idée que du matériel fongique hiberne dans les bourgeons mais le résultat obtenu peut paraître faible, voir dérisoire compte tenu qu'une seule pousse drapeau a été observée sur 107 tiges débourrées soit un taux de présence de 0,93 %. Toutefois, ce taux reste dans les ordres de grandeur de présence de pousses drapeaux sur la forêt du Gâvre d'où proviennent les tiges ainsi que ceux sur la France. En effet le taux obtenu est inférieur d'environ un point par rapport au pourcentage de présence de pousses drapeaux sur la forêt du Gâvre (2,15 %) et est supérieur d'environ un demi-point pour les pourcentages de présence pour la moyenne française : 0,47 % en 2008 et 0,26 % en 2009. (D. PIOU, communication personnelle). A noter que la comparaison se fait entre un taux obtenu en serre et un taux obtenu sur le terrain.

Par ailleurs, la pousse drapeau obtenue ne présentait pas un aspect physiologique habituel comparé à des pousses drapeaux observées dans la nature. En effet la pousse drapeau issue de l'expérience en milieu contrôlé est différente de celles observées dans la nature (Fig. 12). Elle a été observée au stade 10 de l'échelle phénologique du chêne sessile (SECONDAT, 2008 ; MEIER

2001). Compte-tenu que la durée de l'expérience était bien plus longue que celle de l'expérience test (40 jours contre 14 jours), les tiges avaient épuisé toutes leurs réserves nutritives et ainsi la pousse drapeau n'a pas pu se développer d'avantage pour prendre un port classique comme sur la figure 12b. Nous pouvons ainsi en conclure que le symptôme a été visualisé à un stade de développement précoce. Cependant ce port particulier de la pousse pourrait être le résultat d'un stress physiologique lié à l'expérience elle-même (tige coupée, milieu non nutritif, variations températures de la serre...) qui aurait engendré des perturbations dans le développement de l'agent pathogène. Ce stress aurait pu être atténué en réalisant une mise en place plus complexe par l'utilisation de plants et non de tiges mais elle aurait pris bien plus de temps à réaliser, en particulier au niveau du prélèvement des échantillons.

Enfin, une contamination extérieure ne peut pas être exclue pour expliquer l'observation de cette pousse drapeau dans notre expérience. En effet, l'expérience s'est déroulée sous serre réduisant considérablement les contaminations extérieures mais sans les supprimer. Nous avons toutefois effectué l'expérience à une période de l'année (mois de mars) ou la présence d'inoculum primaire d'oïdium (issu de pousses drapeaux (KERLING, 1966) ou correspondant à des ascospores en provenance de chasmothèces (MARÇAIS et al., 2009)) est supposée être nulle. Une expérience en milieu totalement confiné aurait toutefois éliminée totalement les contaminations mais aurait demandée un investissement bien plus lourd au niveau de la mise en place.

En ce qui concerne l'expérience de détection de matériel fongique dans les bourgeons par l'utilisation d'une *nested PCR*, celle-ci est venue appuyer les résultats obtenus au cours de la précédente expérience. Initialement, des doutes ont été émis au niveau des chances de réussite de l'amplification de l'ADN de l'oïdium compte tenu que l'ADN utilisé était un mélange d'ADN de bourgeons et d'ADN du champignon. En effet, du fait de ce mélange, nous nous sommes demandés s'il y avait suffisamment d'ADN de qualité en provenance de l'agent pathogène pour permettre une amplification par la technique de *PCR*. Suite à une expérimentation préliminaire basée sur des mélanges de matériel fongique et végétal, nous avons pu mettre au point une méthode de diagnostic satisfaisante (techniques d'extraction d'ADN et de *nested PCR*) rapide et économique (relativement à d'autres techniques telles que celle de la *PCR* en temps réel) pour répondre aux questions posées. Cette technique de *nested PCR* avait de façon très similaire déjà montrée ses preuves pour des expériences menées sur *Phaeoacremonium aleophilum*, l'un des agents responsable de l'esca touchant la vigne (AROCA et RAPOSO, 2007). L'emploi, d'abord d'amorces universelles permettant l'amplification de n'importe quelle espèce de champignons (GARDES et BRUNS, 1993), puis d'amorces spécifiques au genre *Erysiphe* a montré toute son efficacité pour l'amplification de l'ADN de l'oïdium mélangé à de l'ADN de bourgeons. Le diagnostic par *nested PCR* a donné ainsi des résultats plus que satisfaisants au sujet de la détection de matériels fongiques dans les bourgeons. En effet cette expérience a permis de confirmer la présence d'*E. quercicola* dans les bourgeons (celle d'*E. alphitoides* également ; voir ci-dessous) appuyant par la même occasion les résultats de l'expérience de débourrement qui montre que les pousses drapeaux seraient bien dues à une conservation hivernale de matériel fongique dans les bourgeons. Le taux de présence dans les bourgeons pour cette espèce est de 0,42 % ce qui correspond au taux de présence sur la forêt de la Ferté d'où proviennent les échantillons (taux de présence : 0,41 %) ainsi qu'au taux moyen de présence d'*E. quercicola* en France (0,47 % en 2008 et 0,26 % en 2009). (D. PIOU, communication personnelle).

Des essais effectués avec différentes conditions expérimentales (dilutions de l'ADN utilisées dans la seconde phase de *nested PCR*), nous a toutefois permis de souligner les limites de cette technique de *nested PCR*. Des séquences ITS non homologues à celles des oïdiums des chênes ont

été amplifiées et séquencées. Des séquences ITS se rapprochant de celles de trois champignons qui ne se développent pas sur le chêne ont ainsi été obtenues :

- *Microcyclospora tardicrescens* : champignon appartenant à la famille des capnodiaceés et se développant sur le pommier.
- *Mycosphaerella elongata* : champignon appartenant à la famille des mycosphaerellacées et se développant sur l'eucalyptus.
- *Phaeophleospora atkinsonii* : champignon appartenant à la famille des mycosphaerellacées et se développant sur des espèces du genre *Hebe* connus sous le nom de véronique arbustive.

Leur pourcentage d'homologie n'est pas suffisamment élevé pour conclure que les individus séquencés correspondent aux trois champignons ci-dessus. Néanmoins, nous pouvons conclure que ces individus sont proches de ces trois champignons. Du fait de l'universalité des amorces oligonucleotidiques utilisées (GARDES et BRUNS, 1993), la première phase de la technique de *nested PCR* permet en théorie d'amplifier les régions ITS de tous les champignons potentiellement présents dans ces bourgeons, incluant celles de ces trois champignons. Un manque de spécificité dans les amorces ciblant les régions ITS de l'oïdium des chênes couplé à des conditions d'amplifications particulières (concentration en ADN) lors de la seconde phase de la *nested PCR* a pu conduire à ces amplifications croisées avec d'autres espèces que les oïdiums attendus. Un doute peut être émis sur la réelle spécificité de ces amorces et un nouveau travail de définition d'amorces oligonucleotidiques spécifiques devrait être envisagé pour le diagnostic des espèces responsables de l'oïdium des chênes.

Suite à cette étude, nous pouvons conclure que le symptôme de pousse drapeau semble bien être une des conséquences de la conservation hivernale de matériel fongique d'oïdium dans les bourgeons de chêne en dormance. Toutefois, nous ne pouvons préciser la nature de ce matériel ainsi que sa localisation dans le bourgeon. En effet, nous avons tenté de faire des observations microscopiques sur des bourgeons disséqués contenant de l'oïdium (positif avec notre diagnostic de *nested PCR*), en tentant de colorer le matériel fongique. Le but de cette observation était d'essayer de visualiser du mycélium, des conidies ou des chasmothèces et de les localiser dans le bourgeon. L'expérience n'a pas été concluante. En effet, le produit utilisé colore n'importe quelle espèce fongique sans faire de distinction. Par conséquent, il était impossible de dire si le matériel coloré correspondait à celui de l'oïdium. Cette difficulté de détection de matériel fongique dans les bourgeons a déjà été rencontrée auparavant par SALL et WRYSINSKI (1982) qui ont tenté de mettre en évidence, à l'aide d'une coloration à la phloxine B, la présence de mycélium septé d'*Erysiphe necator* au niveau des feuilles et des pousses primordiales des bourgeons de vigne. Comme pour notre étude, ces auteurs ont détecté du mycélium mais sans pouvoir confirmer s'il s'agissait ou non de mycélium d'*E. necator* compte-tenu de la présence, en plus, dans les bourgeons de spores d'*Alternaria* spp. Par ailleurs, RÜGNER et al. (2002) ont réussi à induire des pousses drapeaux chez la vigne suite à l'inoculation de pousses avec des conidies d'*E. necator*. Au cours de cette étude, des examens par microscopie électronique ont permis de visualiser précisément *E. necator* sur et dans les bourgeons de la vigne. Cette technique de microscopie électronique paraît tout à fait envisageable dans le cas de la visualisation *in situ* de matériel fongique d'oïdium des chênes dans les bourgeons. Seulement la technique de microscopie électronique est coûteuse et lourde à mettre en place. Par conséquent, elle était difficilement concevable pour notre étude.

Comme indiqué précédemment dans la partie 1.3, l'oïdium des chênes est une maladie polycyclique due essentiellement à deux espèces en Europe : *E. alphitoides* et *E. quercicola*. A la vue des résultats de notre étude et des expériences passées, il se pourrait que chacune de ces deux

espèces présente un cycle biologique distinct et différent puisque l'espèce *E. alphitoides* présenterait un cycle biologique complet avec une phase sexuée (conservation hivernale et génération d'un inoculum primaire sous la forme d'ascospores) et des phases asexuées (conidies) tandis qu'*E. quercicola* présenterait uniquement un cycle asexuée (survie hivernale dans les bourgeons en dormance et génération d'un inoculum primaire sous la forme de conidies générées via les pousses drapeaux) compte-tenu que jusqu'à présent aucun chasmothèces lié à cette espèce n'a été observé en France. Par ailleurs, le diagnostic par *nested PCR* a permis de mettre à jour un résultat auquel nous ne nous attendions absolument pas : la présence de matériel fongique lié à *E. alphitoides* dans les bourgeons. En effet, étant donné que les symptômes de pousse drapeau sont strictement liés à *E. quercicola* (FEAU et al, 2010), nous ne nous attendions pas à trouver du matériel fongique lié à *E. alphitoides* dans les bourgeons en dormance.

Suite à cette découverte, nous nous sommes demandés si les pousses drapeaux étaient uniquement associées à *E. quercicola* et donc s'il était possible qu'*E. alphitoides* soit également associée aux pousses drapeaux. La réalisation d'une expérience de contrôle sur des pousses drapeaux provenant de la forêt domaniale de la Ferté (71) a permis de répondre à cette question. Malgré un effectif faible (14 échantillons dont 5 qui se sont révélés positifs), l'expérience a confirmé que les pousses drapeaux correspondent bien à *E. quercicola* levant ainsi le doute.

5. Conclusion et perspectives

Cette étude, nous a permis d'approfondir les connaissances sur l'épidémiologie de l'oïdium des chênes et de répondre aux questions posées sur sa survie hivernale en confirmant tout particulièrement que l'espèce *E. quercicola* hiberne dans les bourgeons de chênes en dormance.

La présence d'*E. quercicola* dans les bourgeons est un point clé dans le développement et la propagation de l'agent pathogène puisqu'elle permet l'apparition d'un symptôme précoce de pousse drapeau au printemps produisant un inoculum primaire en parfaite synchronisation avec le débourrement des feuilles de chênes et permettant ainsi le redémarrage de la saison épidémique. De plus, la confirmation de la présence d'*E. quercicola* dans les bourgeons est en parfaite cohérence avec les résultats sur une succession temporelle entre cette espèce et *E. alphitoides* (FEAU et al. 2010) bien que ce dernier soit également, pour notre plus grand étonnement, présent dans les bourgeons en dormance. Cette dernière découverte laisse en suspens des questions au sujet de l'épidémiologie de l'oïdium des chênes :

- Malgré sa présence dans les bourgeons, pourquoi *E. alphitoides* ne conduit-il pas au développement de pousses drapeaux tout comme *E. quercicola* ?
- Compte-tenu que les deux espèces ont été détectées en mélange dans des bourgeons, quelle est la relation entre les deux espèces au sein des bourgeons ?

Une des hypothèses les plus envisageables actuellement est qu'*E. alphitoides* contaminerait bien les bourgeons durant l'automne mais qu'il n'aurait soit pas les capacités à survivre durant l'hiver, soit pas les capacités à se développer au printemps contrairement à *E. quercicola*.

En définitif, il est nécessaire d'apporter des réponses à ces questions afin de comprendre le rôle exact joué par *E. alphitoides* et *E. quercicola* dans le complexe « oïdium des chênes » et ainsi mieux comprendre le fonctionnement et la propagation de la maladie.

Références bibliographiques

- **AGRIOS G.N.**, 2005. Plant pathology, fifth edition. Elsevier Academic Press, London, UK. 922 p.
- **ARNESON P.A.**, 2001. Plant Disease Epidemiology: Temporal Aspects [en ligne]. Cornell University, Ithaca, NY. [consulté le 9 juillet 2010]. Disponible sur : <<http://www.apsnet.org/education/AdvancedPlantPath/Topics/Epidemiology/Epidemiology.htm>>.
- **AROCA A., RAPOSO R.**, 2007. PCR-based strategy to detect and identify species of *Phaeoacremonium* causing grapevine diseases. Applied and Environmental Microbiology, 73, p. 2911–2918.
- **BRAUN U., TAKAMATSU S.**, 2000. Phylogeny of Erysiphe, Microsphaera, Uncinula (Erysipheae) and Cystotheca, Podosphaera, Sphaerotheca (Cystothecae) inferred from rDNA ITS sequences – some taxonomic consequences. Schlechtendalia, 4, p.1–33.
- **CORTESI P., BISIACH M., RICCIOLINI M. and GADOURY D.M.**, 1997. Cleistothecia of *Uncinula necator* – An additional source of inoculum in Italian vineyards. Plant Disease, 81, p. 922–926.
- **CROUS P.W., GROENEWALD J.Z., PONGPANICH K., HIMAMAN W., ARZANLOU M.**, 2004. Cryptic speciation and host specificity among *Mycosphaerella* spp. occurring on Australian *Acacia* species grown as exotics in the tropics. Studies in mycology, 50, p. 457–469.
- **DEREEPER A., GUIGNON V., BLANC G., AUDIC S., BUFFET S., CHEVENET F., DUFAYARD J.-F., GUINDON S., LEFORT V., LESCOT M., CLAVERIE J.-M., GASCUEL O.**, 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Research, 36, p. 465–469.
- **DESPREZ-LOUSTAU M.-L.**, 2002. L'oïdium du chêne, une maladie fréquente mais mal connue. In : Les cahiers du DSF, 1-2002 (La santé des Forêts [France] en 2000 et 2001), Min. Agri. Alim. Pêche Aff. Ru. (DERF), Paris. p. 95–99.
- **FEAU N., LAURON-MOREAU A., DUTECH C. DESPREZ-LOUSTAU M.L.**, 2010. Distribution temporelle au sein d'un complexe d'espèces : l'Oïdium des chênes. Journées Jean Chevaugéon (VIII^e rencontres de Mycologie/Phytopathologie) organisées par la société française de Phytopathologie, 20-29 Janvier, Aussois, France.
- **GARDES M., BRUNS T. D.**, 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology, 2, p. 113–118.
- **GLAWE D.A.**, 2008. The powdery mildews : a review of the world's most familiar (yet poorly known) plant pathogens. Annual review of phytopathology. 46, p. 27–53.
- **KERLING L.C.P.**, 1966. The hibernation of the oak mildew. Acta Botanica Neerlandica, 15, p. 76–83.

- **LANIER L., JOLY P., BONDOUX P. and BELLEMERE A., 1978.** *Mycologie et Pathologie Forestière*. Paris : MASSON éditeur. Tome 1, Mycologie Forestière. 478 p.
- **LANIER L., JOLY P., BONDOUX P., BELLEMERE A., 1976.** *Mycologie et Pathologie Forestière*. Paris : MASSON éditeur. Tome 2, Pathologie forestière. 487 p.
- **LIMKAISANG S., CUNNINGTON J.H., LIEW K.W., SALLEH B., SATO Y., DIVARANGKOON R., FANGFUK W., TO-ANUN C., TAKAMATSU S., 2006.** Molecular phylogenetic analyses reveal a close relationship between powdery mildew fungi on some tropical trees and *Erysiphe alphitoides*, an oak powdery mildew. *Mycoscience*, 47, p. 327–335.
- **MARÇAIS B., KAVKOVA M., DESPREZ-LOUSTAU M-L., 2009.** Phenotypic variation in the phenology of ascospore production between European populations of oak powdery mildew. *Annals of Forest Sciences*, 66, p. 814–821.
- **MEIER U., 2001.** Stades phénologiques des mono- et dicotylédones cultivées. BBCH Monographie. 2^{ème} édition. Braunschweig, Allemagne. Centre Fédéral des Recherches Biologiques pour l’Agriculture et les Forêts. 166 p.
- **MOUGOU A., DUTECH C., DESPREZ-LOUSTAU M-L., 2008.** New insights into the identity and origin of the causal agent of oak powdery mildew in Europe. *Forest Pathology*. 38, p. 275-287.
- **MOUGOU-HAMDANE A., GIRESE X., DUTECH C., DESPREZ-LOUSTAU M-L., 2010.** Spatial distribution of lineages of oak powdery mildew fungi in France, using quick molecular detection methods. *Annals of Forest Science*, n° 67, p. 212–231.
- **MOUGOU-HAMDANE A., 2009.** Interaction chêne-oïdium : caractérisation moléculaire et adaptation locale du parasite, résistance génétique de l’hôte. Thèse de doctorat, spécialité : écologie évolutive, fonctionnelle et des communautés : Université de Bordeaux 1. 162 p.
- **NAGELEISSEN L.-M., 2000.** Quelques indicateurs de la santé des forêts françaises. Les cahiers du DSF, 1-2000 (La Santé des Forêts [France] en 1999), Min. Agri.Pêche (DERF), Paris, p. 16–17.
- **NEWSHAM K.K., LOW M.N.R., MCLEOD A.R., GREENSLADE P.D., EMMETT B.A., 1997.** Ultraviolet-B radiation influences the abundance and distribution of phylloplane fungi on pedunculate oak (*Quercus robur*). *New Phytologist*, 136, p. 287–297.
- **NEWSHAM K.K., OXBOROUGH K., WHITE R., GREENSLADE P.D., MCLEOD A.R., 2000.** UV-B radiation constrains the photosynthesis of *Quercus robur* through impacts on the abundance of *Microsphaera alphitoides*. *Forest Pathology*, 30, p. 265–275.
- **RÜGNER A., RUMBOLZ J., HUBER B., BLEYER G., GISI U., KASSEMAYER H.-H., GUGGENHEIM R. 2002.** Formation of overwintering structures of *Uninula necator* ad colonization of grapevine under field conditions. *Plant Pathology*, 51, p. 322–330.
- **RUMBOLZ J., GUBLER W.D., 2005.** Susceptibility of grapevine buds to infection by powdery mildew *Erysiphe necator*. *Plant Pathology*, 54, p. 535–548.

- **SALL M.A., WRYSINSKI J.**, 1982. Perennation of powdery mildew in buds of grapevines. *Plant Disease*, 66, p. 678–679.
- **SECONDAT N.**, 2008. Etude de la phénologie du chêne sessile (*Quercus petraea*). Rapport de stage Master I : université Bordeaux 1. 16 p.
- **SOUTRENON A.**, 1998. Une expérimentation pluri-annuelle confirme l'impact de l'oïdium du chêne sur de jeunes sujets. *Les cahiers du DSF, 1-1998 (La Santé des Forêts [France] en 1997)*, Min. Agri. Pêche (DERF), Paris. p. 93–94.
- **TAKAMATSU S., BRAUN U., LIMKAISANG S., KOM-UN S., SATO Y., CUNNINGTON, J.H.**, 2007. Phylogeny and taxonomy of the oak powdery mildew *Erysiphe alphitoides* sensu lato. *Mycological Research*, 111, p. 809–826.
- **TAKAMATSU S., HIRATA T., SATO Y.**, 1999. Phylogenetic analysis and predicted secondary structures of the rDNA internal transcribed spacers of the powdery mildew fungi (Erysiphaceae). *Mycoscience*, 39, p. 441–453.
- **THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J.**, 1994. CLUTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, p. 4673–4680.
- **ZOLAN M.E., PUKKILA P.J.**, 1986. Inheritance of DNA Methylation in *Coprinus cinereus*. *Molecular and Cellular Biology*, 6, p. 195–200.

Liste des contacts

Nom	Organisme	Fonction	Adresse	Téléphone	Adresse électro
Nicolas FEAU	INRA	Post-doctorant	UMR BIOGECO - INRA Laboratoire de Pathologie forestière 69, route d'Arcachon 33612 CESTAS	05.57.12.27.30	nfeau@bordeaux.inra.fr
Dominique PIOU	DSF - INRA	Ingénieur responsable de l'antenne spécialisé du DSF de l'INRA de Bordeaux	INRA Pierroton, 69, route d'Arcachon 33612 CESTAS	05.57.12.27.26	piou@pierroton.inra.fr
Thierry HARDY	ONF	Correspondant observateur	ONF – Maison Forestière de Largilly 71360 SULLY	03.85.52.46.49	Thierry.hardy@onf.fr
Mickaël RICORDEL	ONF	Correspondant observateur	Maison forestière de Néricourt 44130 LE GAVRE	02.40.51.22.51	Mickael.ricordel@onf.fr
Louis-Michel NAGELEISEN	DSF - INRA	Ingénieur responsable de l'antenne spécialisé du DSF de l'INRA de Champenoux	INRA Centre de Nancy 54280 CHAMPENOUX	03 83 39 40 72	nageleisen.dsf@wanadoo.fr

Table des annexes

Annexe 1 : Echelle phénologique du chêne sessile (<i>Quercus petraea</i>).....	50
Annexe 2 : Détermination du nombre de tiges à prélever sur le terrain pour l'expérience de débourrement en milieu contrôlé.....	52
Annexe 3 : Préparation de l'échelle de concentration d'ADN d'oïdium	54
Annexe 4 : Protocole d'extraction d'ADN avec le kit Invisorb [®]	56
Annexe 5 : Protocole d'extraction avec le kit NucleoSpin [®]	58
Annexe 6 : Détermination du nombre de bourgeons à prélever pour l'expérience de détection de matériel fongique d'oïdium dans les bourgeons	60
Annexe 7 : Protocole d'extraction individuelle d'ADN d'oïdium de chêne.....	61
Annexe 8 : Gel d'ADN total obtenu lors de l'expérience préliminaire de détection de matériel fongique dans les bourgeons	62

**Annexe 1 : Echelle phénologique du chêne sessile (*Quercus petraea*) source :
SECONDAT, 2008 ; MEIER, 2001)**
Stade principal 0 : Développement des bourgeons

Stade 00 : Période de dormance hivernale : les bourgeons sont fermes et recouverts d'écailles brunes.

Stade 01 : La majorité des bourgeons foliaires ont commencé à gonfler : leurs écailles s'allongent et ils deviennent légèrement plus clairs aux extrémités.

Stade 03 : La majorité des bourgeons foliaires ont fini de gonfler et sont prêts à éclater : ils deviennent plus arrondis aux extrémités.

Stade 07 : Début de l'éclatement des bourgeons et du développement des pousses : les extrémités des feuilles vertes deviennent visibles.

Stade 09 : Le bout des premières feuilles sont clairement visibles et dépassent l'extrémité des écailles du bourgeon.

Stade principal 1 : Développement des feuilles

Stade 10 : Les premières feuilles sortent des bourgeons, se séparent et commencent à s'étaler

Stade 11 : Les premières feuilles sont étalées sur environ 10% du houppier.

Stade 12 : Les premières feuilles sont étalées sur environ 20% du houppier.

Stade 13 : Les premières feuilles sont étalées sur environ 30% du houppier.

Stade 14 : Les premières feuilles sont étalées sur environ 40% du houppier.

Stade 15 : Les premières feuilles sont étalées sur environ 50% du houppier.

Stade 16 : Les premières feuilles sont étalées sur environ 60% du houppier.

Stade 17 : Les premières feuilles sont étalées sur environ 70% du houppier.

Stade 18 : Les premières feuilles sont étalées sur environ 80% du houppier.

Stade 19 : Les premières feuilles sont étalées sur environ 90% du houppier.

Stade principal 3 : Développement des pousses

Stade 31 : Les pousses et les feuilles débutent leur croissance : l'axe des pousses devient visible ; les feuilles sont petites et ne sont pas encore totalement déployées.

Stade 33 : Les pousses et les feuilles sont en pleine croissance. Les feuilles sont fines, de couleur vert tendre et leurs nervures sont peu marquées.

Stade 35 : Les feuilles s'épaississent mais restent d'un vert clair. Leurs nervures commencent à se marquer. Les pousses sont toujours en croissance.

Stade 37 : Les pousses sont sur la fin de leur croissance et commencent à se lignifier. Les feuilles ont quasiment atteint leur taille finale, sont épaisses et d'un vert foncé. Leurs nervures sont marquées.

Stade 39 : Les pousses ont terminé leur croissance et sont lignifiées. Les feuilles sont vertes foncées, épaisses et ont atteint leur taille finale. Leurs nervures sont bien marquées.

Stade principal 9 : Sénescence et début de la phase de repos ou de dormance

Stade 90 : Les premières feuilles du houppier ont commencé à virer de couleur ou à tomber.

Stade 91 : 10% des feuilles du houppier ont viré de couleur ou sont tombées.

Stade 92 : 20% des feuilles du houppier ont viré de couleur ou sont tombées.

Stade 93 : 30% des feuilles du houppier ont viré de couleur ou sont tombées.

Stade 94 : 40% des feuilles du houppier ont viré de couleur ou sont tombées.

Stade 95 : 50% des feuilles du houppier ont viré de couleur ou sont tombées.

Stade 96 : 60% des feuilles du houppier ont viré de couleur ou sont tombées.

Stade 97 : 70% des feuilles du houppier ont viré de couleur ou sont tombées.

Stade 98 : 80% des feuilles du houppier ont viré de couleur ou sont tombées.

Stade 99 : 90% des feuilles du houppier ont viré de couleur ou sont tombées.

Annexe 2 : Détermination du nombre de tiges à prélever sur le terrain pour l'expérience de débourrement en milieu contrôlé
But de l'opération :

Il s'agit ici de déterminer le nombre d'échantillons (sous la forme tige coupée ou plant avec racines) qu'il faut prélever sur le terrain afin d'obtenir au moins une pousse drapeau en milieu contrôlé (serre) en tenant compte du taux de pousses drapeaux présentes sur le terrain ainsi que du taux de débourrement en milieu contrôlé.

Ces taux ne sont pas connus ainsi les calculs ont été réalisés sur différents taux de débourrement et de taux de pousses drapeaux qui sont les suivants :

- taux de débourrement : 0,5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 100%.
- taux de pousses drapeaux : 0,04% ; 0,05% ; 0,06% ; 0,07% ; 0,08% ; 0,09% ; 0,1% ; 0,15% ; 0,2% ; 0,25% 0,3%. (L'intervalle de cette échelle englobe les taux qui ont été notés sur le terrain).

Calcul utilisé :

Soit X la variable aléatoire égale au nombre de pousses drapeaux obtenues en laboratoire, nous avons : $P(X \geq 1) = 1 - P(X = 0) = 1 - (1 - P(X=1))^n$, n étant le nombre d'échantillons. Etant donné que nous devons tenir compte du taux de débourrement, la probabilité $P(X)$ correspond à la probabilité d'avoir à la fois du débourrement et des pousses drapeaux soit : $P(D \cap I)$ avec $P(D)$: probabilité d'avoir du débourrement et $P(I)$ Probabilité d'avoir des pousses drapeaux sur le terrain. Ainsi nous obtenons les données présentées dans le tableau 14 dans le cas d'un taux de débourrement de 1%.

En considérant un intervalle de confiance de 95 %, autrement dit un seuil de confiance de 5 %, la probabilité d'avoir au moins un échantillon avec des pousses drapeaux est de 0,95. Ainsi il suffit de déterminer le nombre d'échantillons qu'il faut prélever pour avoir une probabilité de 0,95 (variation de n). Pratiquement, des tableaux ont été mis en place dans lesquels les probabilités $D \cap I$ varient en colonnes et le nombre d'échantillons varie en lignes (de 0 à 1000).

Une marge de sécurité a été prise en compte pour le taux de débourrement et le taux de présence de pousses drapeaux pour ne pas sous-estimer l'échantillonnage. De ce fait, le nombre d'échantillons à prélever est une moyenne des nombres d'échantillons calculés en fonction de la marge du taux de débourrement et du taux de présence de pousses drapeaux (Tableau 15). Ainsi le nombre de prélèvements a été établi à 200 individus.

Tableau 14 — Résultats du calcul de la probabilité d'avoir à la fois du débourrement et des pousses drapeaux.

P (D)	0,6											
P (I)	0,004	0,005	0,006	0,007	0,008	0,009	0,01	0,015	0,02	0,025	0,03	
P (D∩I)	0,0024	0,003	0,0036	0,0042	0,0048	0,0054	0,006	0,009	0,012	0,015	0,018	

Tableau 15 —détermination du nombre d'échantillons à prélever sur le terrain en fonction du taux de débourrement et du taux de présence de pousses drapeaux.

		Taux de débourrement										
		5 %	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %	70 %	80 %	90 %	100 %
Taux de pousses drapeaux	0,4 %									940	830	750
	0,5 %							1000	850	750	660	600
	0,6 %						1000	830	710	620	550	500
	0,7 %						850	710	610	530	470	430
	0,8 %					940	750	620	530	470	420	380
	0,9 %					830	660	550	470	410	370	340
	1,0 %				1000	750	600	500	430	370	330	300
	1,5 %			1000	660	500	400	330	280	250	220	200
	2,0 %			750	500	380	300	250	210	190	170	150
	2,5 %			600	400	300	240	200	170	150	130	120
	3,0 %		1000	500	330	250	200	170	140	120	110	100

Annexe 3 : Préparation de l'échelle de concentration d'ADN d'oïdium

- Préparation d'une solution mère de conidies

Afin de préparer la solution mère, des conidies sont prélevées sur des feuilles de plants inoculés et placés en chambre climatique. Pour cela, le mycélium situé sur les feuilles inoculées est brossé à l'aide d'un pinceau au-dessus d'une feuille d'aluminium dans le but de récupérer des conidies. Ensuite les conidies récoltées sont déposées dans un tube "Eppendorf". Puis 400 µL d'eau distillée sont versés dans le tube. Enfin on ajoute une goutte de *twin* (prélevée avec le bout d'un embout de pipette) qui va permettre d'éviter la formation d'agrégats de conidies. Le tout est agité pour créer une suspension.

- Comptage des conidies

Le comptage s'effectue grâce à un hémacytètre (cellule de Malassez). Pour cela, 10 µL sont prélevés dans la solution mère, auxquels 40 µL d'eau distillée sont ajoutés pour réaliser une dilution par cinq afin de faciliter le comptage. Le procédé est répété en tout cinq fois afin d'avoir cinq solutions diluées par cinq.

La cellule de Malassez est ensuite préparée avant l'injection de la solution diluée. Une lamelle spéciale hémacytètre (20 x 20 x 0,4 mm) est placée sur cette cellule préalablement humectée pour que la lamelle tienne sur la lame. Une fois la lamelle fixée sur la lame, 15 µL de la solution diluée sont injectés entre la lame et la lamelle au niveau du coin gauche inférieur de la lamelle. On vérifie que l'injection s'est bien étalée sur la cellule de Malassez puis la lame est placée sous un microscope au grossissement 200.

Une cellule de Malassez est composée de 25 rectangles de 0,01 mm³ composés eux-mêmes de 20 carrés (Figure 20) Le comptage se fait sur les 25 rectangles : le nombre de conidies pour chaque rectangle est comptabilisé. Ensuite, la moyenne du nombre de conidies sur les 25 rectangles est effectuée. Ainsi un nombre moyen de conidies est obtenu pour un rectangle, soit un nombre moyen de conidies pour 0,01 µL. Il suffit de multiplier ce nombre par 10 000 pour obtenir le nombre de conidies présent pour 100 µL dans la solution diluée puis par 5 pour obtenir le nombre moyen de conidies pour 100 µL dans la solution mère. A noter que pour chaque tube de dilution, deux comptages sont réalisés, soit en tout dix comptages (5 dilutions x 2 comptages)

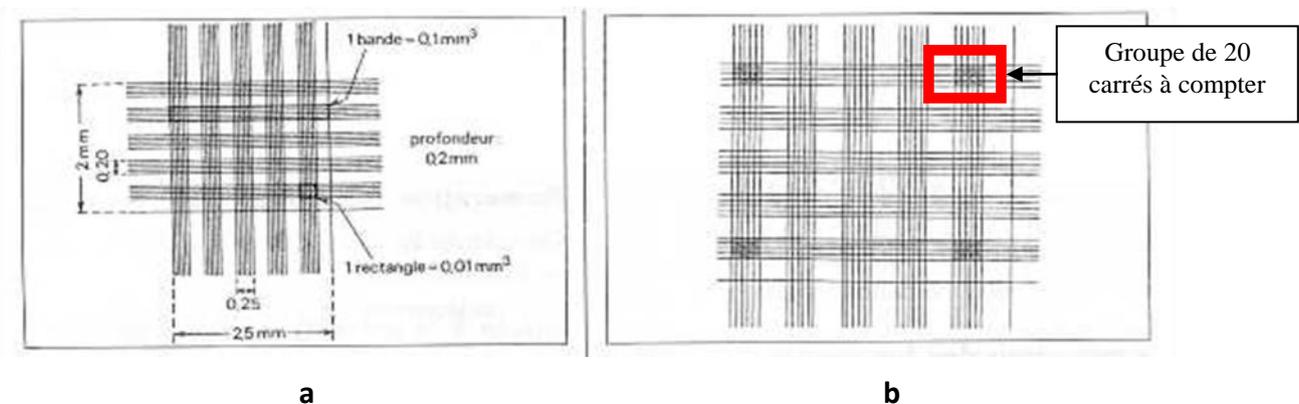


Figure 20 — Description de la cellule de Malassez. (a) Quadrillage de la cellule de Malassez. (b) Cellule de Malassez : nombre d'hématies / mm³ = N hématies (total des quatre carrés grisés) x 5 000.

- Préparation des dilutions

Une fois la concentration de la solution mère déterminée, les différentes dilutions sont réalisées à partir celle-ci afin d'obtenir un panel de concentrations contenant : 100 000, 50 000, 10 000, 1 000, 100 ou 10 conidies pour 100 μ L.

Annexe 4 : Protocole d'extraction d'ADN avec le kit Invisorb®

1. Broyage des bourgeons :

- Placer une bille de tungstène de 4 mm dans chaque tube,
- Plonger les plaques quelques secondes dans de l'azote liquide pour refroidir rapidement les bourgeons et faciliter le broyage,
- Placer les tubes dans les plaques de broyage,
- Broyer pendant 30 secondes à une fréquence, Hz = 30 / s.
- Replonger les plaques quelques secondes dans l'azote liquide
- Broyer pendant une minute à une fréquence, Hz = 25 / s

2. Incubation des échantillons dans le tampon de lyse

- Préparer le tampon de lyse avec pour chaque tube :
 - o 400 µL *Lysis buffer P*
 - o 20 µL protéine k
 - o 40 µL RNase A

 total solution tampon : 460 µL
- Ajouter 460 µL de tampon de lyse dans chaque tube,
- Incuber à 65°C pendant 1h.

3. Pré-filtration

- Transférer la solution des tubes dans des colonnes de pré-filtration (avec des tubes de 2 mL disposés en-dessous),
- Transférer 350 µL du lysat (ne prendre que le surnageant),
- Centrifuger environ dix secondes à 500 rpm (trois fois si mal filtré),
- Garder le filtrat et jeter la colonne.

4. Accrochage de l'ADN sur la membrane

- Ajouter 350 µL de *Binding tampon P* dans chaque tube contenant le filtrat,
- Transférer la suspension sur une colonne permettant l'accrochage de l'ADN (avec des tubes de 2 mL placé en-dessous),
- Incuber une minute à température ambiante.

5. 1^{er} lavage

- Ajouter 500 µL de WB I dans chaque puits après avoir placé en dessous du bloc MN Square-well des tubes collecteurs,
- Centrifuger 5 min à 4 000 rpm à température ambiante,
- Garder la membrane sur laquelle est accroché l'ADN et vider le contenu des tubes collecteurs.

6. 2^e lavage

- Ajouter 700 µL de WB II dans chaque puits après avoir placé en dessous des tubes collecteurs,
- Centrifuger 2 min à 4 000 rpm,
- Garder la membrane sur laquelle est accroché l'ADN et vider le contenu des tubes collecteurs.

7. Elimination des restes d'éthanol : séchage

- Placer les colonnes contenant l'ADN sur des tubes collecteurs,
- Placer un film de perméable au gaz sur les plaques pour éviter de polluer les tubes,
- Centrifuger à puissance maximale pendant 15 minutes à température ambiante.
- Garder la membrane sur laquelle est accroché l'ADN et vider le contenu des tubes collecteurs.

8. Elution de l'ADN

- Placer les colonnes contenant l'ADN sur de nouveaux tubes collecteurs (1 mL),
- Ajouter 50 µL de tampon d'éluion (Buffer D) sur la membrane de chaque tube,
- Laisser incuber 5 min à température ambiante,
- Centrifuger 5 min à 4 000 rpm,
- Ajouter à nouveau 50 µL de Buffer D,
- Laisser incuber 5 min
- Centrifuger 5 min à 4 000 rpm,
- Garder les tubes collecteurs contenant l'ADN et jeter les colonnes.

Annexe 5 : Protocole d'extraction avec le kit NucleoSpin®

1. Broyage des bourgeons :

- Placer une bille de tungstène de 4 mm dans chaque tube (96 tubes),
- Plonger les plaques quelques secondes dans de l'azote liquide pour refroidir rapidement les bourgeons et faciliter le broyage,
- Placer les tubes dans les plaques de broyage,
- Broyer pendant 30 secondes à une fréquence Hz = 30/s.

2. Incubation des échantillons dans le tampon de lyse

- Préparer le tampon de lyse :
 - o 500 µL Buffer PL1
 - o 10 µL RNase

 Total solution tampon : 510 µL
- Ajouter 510 µL de tampon de lyse dans chaque tube,
- Centrifuger 1 min à 3500 rpm,
- Incuber à 65°C pendant 1h.

3. Nettoyage du lysat par centrifugation

- Centrifuger les échantillons pendant 20 min à pleine vitesse (14 000 rpm).

4. Fixation ADN

- Mettre 450 µL de Buffer PC dans les puits d'un bloc MN Square-well,
- Ajouter 400 µL du lysat nettoyé,
- Mélanger au moins 3 fois c'est-à-dire aspirer avec la pipette la solution buffer + lysat puis éjecter le produit et répéter ça 2 fois,
- Transférer 800 µL du contenu de chaque puits dans un bloc MN Square-well,
- Centrifuger à 13 000 rpm pendant 5 min.
- Garder la colonne avec la membrane sur laquelle l'ADN est fixé.

5. 1^{er} lavage

- Ajouter 400 µL de PW2 dans chaque puits après avoir placé en dessous du bloc MN Square-well des tubes collecteurs,
- Centrifuger 2 min à 14 000 rpm,
- Garder la membrane et vider les tubes collecteurs.

6. 2^e lavage

- Ajouter 700 µL de PW2 dans chaque puits après avoir placé en dessous du bloc MN Square-well des tubes collecteurs,
- Centrifuger 2 min à 14 000 rpm,
- Garder la membrane et vider les tubes collecteurs.

7. 3^e lavage

- Ajouter 700 μ L de PW2 dans chaque puits après avoir placé en dessous du bloc MN Square-well des tubes collecteurs,
- Centrifuger 2 min à 14 000 rpm,
- Garder la membrane et vider les tubes collecteurs.

8. Séchage

- Placer les colonnes contenant l'ADN sur des tubes collecteurs,
- Placer un film de perméable au gaz sur les plaques pour éviter de polluer les tubes,
- Centrifuger 10 min (maximum) à 14 000 rpm.

9. Elution de l'ADN

- Placer les colonnes contenant l'ADN sur de nouveaux tubes collecteurs,
- Ajouter 100 μ L de Buffer PE (préchauffé à 70°C) dans chaque puits,
- Laisser incuber 2 min à température ambiante,
- Centrifuger 2 min à 14 000 rpm,
- Garder les tubes collecteurs contenant l'ADN et jeter les colonnes.

Annexe 6 : Détermination du nombre de bourgeons à prélever pour l'expérience de détection de matériel fongique d'oïdium dans les bourgeons**But de l'opération :**

Il s'agit ici de déterminer le nombre de bourgeons qu'il faut prélever sur des tiges récoltées sur la forêt domaniale de la Ferté (71) afin de détecter au moins un bourgeon contenant du matériel fongique d'oïdium en tenant compte du taux de pousses drapeaux présentes sur le terrain. Ce taux se situe 0,3 % et 0,6 %.

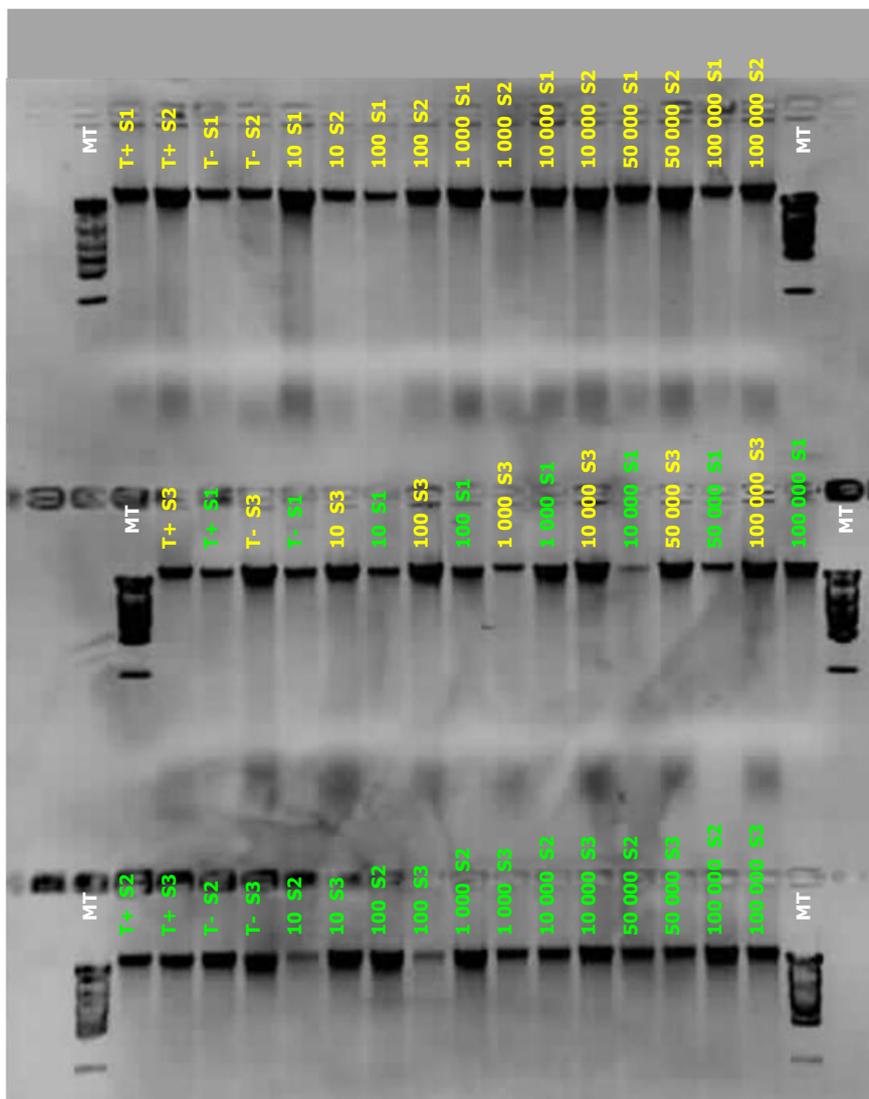
Calcul utilisé :

Soit X la variable aléatoire égale au nombre de bourgeons contenant du matériel fongique d'oïdium, nous avons : $P(X \geq 1) = 1 - P(X = 0) = 1 - (1 - P(X=1))^n$, n étant le nombre d'échantillons. En considérant un intervalle de confiance de 95 %, autrement dit un seuil de confiance de 5 %, la probabilité d'avoir au moins un bourgeon infecté par l'oïdium est de 0,95. Ainsi il suffit de déterminer le nombre d'échantillons qu'il faut prélever pour avoir une probabilité de 0,95 (variation de n). Pratiquement, des tableaux ont été mis en place dans lesquels le taux de présence de pousses drapeaux sur le terrain varient en colonnes et le nombre de bourgeons varie en lignes (de 0 à 1000). Ainsi le nombre de bourgeons à prélever a été fixé à 1 000. Nous avons estimé que nous pouvions prélever en moyenne dix bourgeons par tiges. Par conséquent, 100 tiges de chênes devront être prélevées sur le terrain.

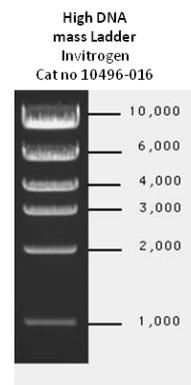
Annexe 7 : Protocole d'extraction individuelle d'ADN d'oïdium des chênes

1. Mettre les échantillons d'oïdium dans les tubes.
2. Ajouter 400 μL de tampon CTAB 1X et 0,5% de β mercaptoethanol.
3. Vortexer rapidement et placer dans l'incubateur à 65°C pendant plusieurs heures en agitant en permanence (minimum 3 h).
4. Ajouter 400 μL de Chloroforme-Isoamylalcool sous la sorbonne et vortexer pendant une dizaine de secondes.
5. Centrifuger les tubes 10 min à vitesse maximale et à 4°C (de préférence).
6. Transférer la phase aqueuse (environ 350 μL) dans un nouveau tube
7. Ajouter à nouveau 400 μL de Chloroforme-Isoamylalcool et vortexer pendant une dizaine de secondes.
8. Centrifuger les tubes 10 min à vitesse maximale et à 4°C (de préférence).
9. Transférer la phase aqueuse (environ 300 μL) dans un nouveau tube.
10. Ajouter $\frac{3}{4}$ volume d'isopropanol (200 μL). Agiter doucement pendant environ 1 min.
11. Laisser précipiter l'ADN toute la nuit à -20°C.
12. Centrifuger 10 min à vitesse maximale à 4°C (de préférence).
13. Eliminer le surnageant, rincer le culot avec 500 μL d'éthanol 95°.
14. Centrifuger 5 min à vitesse maximale à 4°C (de préférence)
15. Eliminer le surnageant, rincer le culot avec 500 μL d'éthanol 70°.
16. Centrifuger 5 min à vitesse maximale à 4°C (de préférence)
17. Eliminer le surnageant.
18. faire sécher le culot d'ADN (plusieurs heures au speed vac).
19. Reprendre le culot dans 20 μL de buffer d'élution d'ADN.

Annexe 8 : Gel d'ADN total obtenu lors de l'expérience préliminaire de détection de matériel fongique dans les bourgeons



Echelle marqueur de taille :



Légende :

10	: nombre de conidies
S1	: série 1
S2	: série 2
S3	: série 3
T-	: témoin négatif bourgeons
T+	: témoin positif bourgeons
MT	: marqueur de taille
Jaune	: kit Invisorb®
Vert	: kit NucleoSpin®

Résumé

L'oïdium des chênes est une maladie fongique très fréquente en Europe, notamment en France, ayant un impact particulièrement important sur les régénérations des chênes blancs (*Quercus robur*, *Q. petraea*, principalement). Elle regroupe sous le même symptôme, de feutrage mycélien blanc, quatre lignées évolutives différentes *Erysiphe alphitoides*, *E. hypophylla*, *E. quercicola* et *Phyllactinia* sp.

La saison épidémique de l'oïdium des chênes débute avec le développement de pousses drapeaux au début du printemps. Celles-ci sont exclusivement liées à l'espèce *Erysiphe quercicola*, tandis que *E. alphitoides* est principalement responsable de symptômes communs qui apparaissent durant le reste de la saison de croissance.

Afin de confirmer l'hypothèse que les pousses drapeaux sont bien associées à un mode de conservation hivernal d'*E. quercicola* sous la forme de matériel fongique dans les bourgeons de chênes, deux expériences complémentaires ont été mises en place au cours de l'étude : une expérience de débourrement de tiges de chênes en milieu contrôlé et une détection moléculaire d'ADN d'oïdium dans des bourgeons en dormance.

Ces deux expériences nous ont permis i. de confirmer l'hypothèse d'hibernation de l'oïdium dans les bourgeons de chênes et ii. de détecter *E. quercicola* mais aussi *E. alphitoides* dans les bourgeons en dormance dont la présence suscite de nouvelles questions quant à la survie hivernale en sympatrie des deux espèces dans les bourgeons.

Mots-clés : Oïdium des chênes / *Erysiphe* spp. / Survie hivernale / Pousses drapeaux / *Nested PCR*