



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

*Master 2 mention Biotechnologies, Microbiologie, Aliment, Nutrition,
Environnement*

Spécialité:

Microbiologie Environnementale et Sanitaire

Thème:

Diagnostic phytopathologique des dépérissements de cerisier
(*Prunus avium*) et prunier (*Prunus domestica*)

Par : **Omar MENAD**

Mars 2015 – Aout 2015

Maîtres de stage :

Cindy Morris³ : Directeur de recherche

Marc Bernardini¹ : Assistant ingénieur

Avec la participation de :

Marine Blouin ¹

Jonathan Gaudin ²

Dominique Blancard ²

¹UE 0393 Unité Expérimentale Arboricole, Bourran, INRA Bordeaux

²UMR 1065 Santé et Agroécologie du Vignoble, INRA Bordeaux

³UR 407, Pathologie Végétale, INRA-PACA, Avignon

Remerciement

En préambule à ce mémoire, je souhaiterais adresser mes remerciements aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail.

Je tiens à remercier sincèrement Monsieur Marc Bernardini et Madame Cindy Morris, qui en tant que maîtres de stage, se sont toujours montrées à l'écoute et disponibles tout au long de mon stage, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'ils m'ont consacrés.

J'exprime ma gratitude à toute l'équipe de l'unité Expérimentale Arboricole pour leur soutien et pour les bon moments de partage qu'on a passé ensemble. Je remercie par la même occasion, Jonathan Gaudin, Dominique Blancard, Thierry Candresse,

Je dédie ce travail à mes chers parents, pour leurs soutien malgré la distance et sans lesquels je ne serai pas là aujourd'hui.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches et amis, qui m'ont toujours soutenu et encouragé pour surmonter les moments difficiles.

Merci à tous

Abréviations

Liste des figures

Introduction

I.	Présentation de l'unité:.....	1
II.	Dépérissement des arbres fruitiers:.....	1
II.1.	Inventaire des causes de dépérissement chez le prunier et le cerisier :	2
II.2.	Les causes physiologiques (abiotiques) :.....	2
II.3.	Les causes parasitaires (biotiques) :	3
II.3.1.	Les maladies cryptogamiques :	3
II.3.2.	Les maladies dues aux bactéries et phytoplasmes :.....	4
II.3.3.	Les maladies virales :.....	5
II.3.4.	Les maladies complexes :.....	5
III.	Le diagnostic en pathologie végétale :.....	6
III.1.	Généralités :	6
III.2.	Le diagnostic généraliste :.....	6
III.3.	Le diagnostic au laboratoire:	7
III.4.	Les techniques de détections :.....	7
IV.	Objectifs du stage :	10

Matériel et méthodes

I.	Description du matériel végétal étudié et des conditions de culture :.....	11
II.	Paramètres à prendre en considération pour le diagnostic des dépérissements :	11
II.1.	Les paramètres agronomiques:	11
II.1.1.	Historique des parcelles :	11
II.1.2.	Qualité du sol et caractéristiques des terrains :	12
II.1.3.	Les données météorologiques :.....	12
III.	Démarches du diagnostic:.....	13
III.1.	Diagnostic visuel et état des lieux :.....	13
III.2.	Description des symptômes et hypothèses :	13
III.3.	Vérification des hypothèses :	14
III.4.	Recherche des causes parasitaires :.....	14
III.4.1.	Echantillonnage :	14
III.4.2.	Analyses bactériologiques (<i>Pseudomonas</i> et <i>Xanthomonas</i>) :	14
III.4.3.	Analyses fongiques :.....	15

Résultats

I.	Description des symptômes de dépérissement et leur répartition par espèce :	17
I.1.	Répartition des symptômes sur les parcelles:	18
I.1.1.	Dépérissement sur cerisier :	18
I.1.2.	Dépérissement sur prunier :	19
II.	Relation entre les facteurs abiotiques et les symptômes de dépérissement (hyp 1):.....	20
II.1.	Les facteurs agronomiques (le sol) :	20
II.2.	Le facteur climatique :	22
III.	Les causes parasitaires (biotiques) :	22
III.1.	Résultats des analyses bactériologiques :	22
III.2.	Résultats des analyses fongiques :	22

Discussion

I.	Intérêt du travail mené lors de cette étude :	26
II.	Eléments de vérification de la première hypothèse (les dépérissements sont d'origine abiotique) :	26
III.	Eléments de vérification de la deuxième hypothèse (les dépérissements sont d'origine parasitaire) :	27
IV.	Conclusion sur l'origine la plus probable des dépérissements :	27
V.	Analyse critique du dispositif cultural et perspective d'amélioration :	28

Références bibliographiques**Annexes**

AND	Acide désoxyribonucléique
ANSES	Agence national de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
APS	Américan plant security
CRG	Centre de ressources génétiques
CVA	Cherry virus A
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GPS	Global Positioning System
INRA	Institut national de la recherche agronomique
ITS	Internal Transcribed Spacers
KBC	King B Cephalexin
MAC	Malt agar chloramphénicol
MLST	Multilocus sequence typing
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next-Generation Sequencing
OEPP	Organisme Européen de Protection des Plantes
PCR	polymerase chain reaction
PPV	Plum pox virus
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RFSV	Réseau Français pour la Santé Végétale
RT PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
UMR	Unité mixte de recherche
UR	Unité de recherche
URGI	Unité de Recherche Génomique Info
YDCA	Yeast dextrose calcium agar

Liste des figures

Figure 1: Images correspondant aux types de symptômes majoritaires, observés sur prunier et cerisier..	17
Figure 2: Image satellite présentant la répartition des symptômes de dépérissements dans la parcelle F2 de cerisier.	18
Figure 3: Plans de répartition des symptômes de dépérissement de type 1, type 2 et des arbres morts sur les parcelles de cerisiers I2 et J2 (Plans actualisés le 20-08-2015).	19
Figure 4: Plan de la parcelle A montrant la répartition des dépérissements (mis à jour le 21-08-2015)	19
Figure 5: Images correspondantes à l'évolution d'un symptôme de dépérissement sur un prunier (<i>P. domestica</i>).	20
Figure 6 : Comparaison de la répartition des zones de dépérissement sur la parcelle F2 et des résultats d'analyse de la résistivité du sol réalisé sur une profondeur de 0 à 1,70m.	21
Figure 7: Exemple de résultat de l'analyse fongique obtenu après isolement sur milieu de culture	23
Figure 8: Profils de migration des produits PCR amplifiés avec les amorces spécifique des séquences ITS, réalisé sur ADN génomiques extrait séparément de 13 mycéliums..	24

Liste des tableaux

Tableau 1: Synthèses des caractéristiques agronomiques et pédologiques des cultures suivies au cours de cette étude.	12
Tableau 2: Pourcentage d'arbres exprimant les symptômes de dépérissement dans les parcelles de cerisier (F2, I2, J2) et prunier (A).	17
Tableau 3: Evènements climatiques correspondant aux années de plantation de la parcelle F2 de cerisiers.	22
Tableau 4: Concentrations des ADN extrait à partir de mycéliums. Les échantillons portant la mention (carpo) signifient que l'ADN a été extrait à partir de carpophore.	23
Tableau 5: Bilan des analyses bactériologiques et fongiques réalisées sur une trentaine d'échantillons prélevés sur prunier et cerisier	25

I. Présentation de l'unité:

L'Unité Expérimentale Arboricole (UEA 0393) est rattachée au département Biologie et Amélioration des Plantes (BAP) de l'INRA. Elle est composée de deux domaines expérimentaux distants de 80 km : le domaine des Jarres à Toulence en Gironde et le domaine de la Tour de Rance à Bourran, dans le Lot et Garonne. 45 ha de la surface totale (120ha) sont consacrés aux arbres fruitiers dont les cerisiers, pruniers, pêchers, et noyers, 14 ha de forêts expérimentales et 1 ha de pépinières fruitières. Environ 5ha de vergers recueillent des collections patrimoniales précieuses de pruniers et cerisiers. Cette collection fait partie du Centre de Ressources Génétiques (CRG) Prunus, qui compte plus de 1000 variétés dont 630 accessions d'origine française et 300 d'origine étrangère.

Les vergers représentent un support de recherche pour des études scientifiques dans le cadre de programme d'innovation variétale et l'inscription des nouvelles variétés par le dispositif DHS (Distinction, homogénéité, stabilité). D'autres études sont menées sur l'impact du réchauffement climatique sur la production des vergers, et sur la production fruitière à bas niveau intrants ayant comme finalité de produire avec un minimum de produits phytosanitaires, d'engrais et d'eau.

Depuis une dizaine d'années, l'état général des vergers se dégrade, on a noté des dépérissements fréquents sur cerisier, prunier et pêcher. Cette situation inquiète les gestionnaires de l'UEA, vu l'importance de ce matériel végétal. L'intérêt du travail présenté dans ce rapport, est de réaliser un rapprochement entre l'état phytosanitaire des vergers et les éventuelles causes des dépérissements observés, pour ensuite trouver des solutions adaptées à ce problème.

II. Dépérissement des arbres fruitiers:

La maladie d'une plante est définie comme une altération de l'état normal par l'interruption ou la modification des fonctions vitales. Elle peut résulter d'une réponse à un stress environnemental, à un agent pathogène, ou la combinaison des deux facteurs (Schubert *et al.*, 1988). Le terme dépérissement est souvent utilisé pour exprimer un état d'affaiblissement progressif d'un végétal atteint d'une maladie à évolution lente, qui selon leur cause et leur gravité entraîne la mort de l'arbre ou de certaines parties (Lichoux *et al.*, 1990). le dépérissement maladif, est rencontré quelque soit l'âge de l'arbre, dans ce cas l'arbre perd ses parties sans régénération du houppier. Ce phénomène peut être progressif ou brutal, allant

jusqu'à la perte des branches charpentières ou la mort de l'arbre (Durand, 2008). On parle aussi de dépérissement lorsque l'arbre devient sénescent et sacrifie ses extrémités pour privilégier les jeunes pousses autour du tronc.

II.1. Inventaire des causes de dépérissement chez le prunier et le cerisier :

Ces deux espèces appartiennent au genre *Prunus*, famille des Rosaceae, retrouvées notamment dans les régions tempérées (Gilani *et al.*, 2013). Elles sont généralement rustiques et s'adaptent à diverses conditions climatiques et agronomiques. Mais il faut rappeler que le développement d'un arbre dépend d'un ensemble complexe de facteurs liés au végétal (équilibre hormonal, variété, porte greffe) et à l'environnement (sol, climat, alimentation hydrique et minérale, la microflore associée ou vivante à proximité et aux pratiques culturales). En effet les causes de dépérissement sont diverses. En France, les causes fréquentes de dépérissement du cerisier sont agronomiques, mais la possibilité que des agents pathogènes soient impliqués n'est pas à écarter (Lichoux *et al.*, 1990).

II.2. Les causes physiologiques (abiotiques) :

Les caractéristiques physico-chimiques d'un sol (structure, pH, humidité, aération ...), sont les premiers paramètres à prendre en considération avant la plantation d'un verger d'arbres fruitiers; ces facteurs sont perçus différemment d'une espèce végétale à l'autre. Si un ou plusieurs éléments présentent un défaut comme un pH très acide, un sol pollué ou trop humide, l'arbre exprime des signes de stress visible ou pas, à court ou à long terme. Par exemple une carence ferrique provoque des décolorations suivant les nervures de la feuille (chlorose), de même une humidité élevée induit une asphyxie racinaire (Lanier, 1973; Schubert *et al.*, 1988). Certains dysfonctionnements peuvent être améliorés en adaptant les pratiques culturales, d'autres sont irréversibles (Lichoux *et al.*, 1990).

Les conditions climatiques, dont la température, la pluviométrie et l'humidité de l'air, jouent un rôle déterminant dans l'adaptation et l'évolution des plantes. Ainsi, un climat défavorable comme un hiver très froid cause des dégâts sur les racines et les bourgeons, de la même façon un été très chaud induit un stress hydrique qui peut provoquer la mort de l'arbre (Lanier, 1973).

Outre les facteurs cités précédemment, l'âge de l'arbre représente aussi un élément à considérer. Généralement les vieux arbres présentent des symptômes de sénescence et des dépérissements résultant d'un désordre physiologique, cette cause peut être confondue avec une cause d'ordre parasitaire, qui exprime les mêmes symptômes (Durand, 2008).

Parmi les désordres physiologiques, l'incompatibilité porte greffe – greffon est aussi l'une des causes de dépérissement. En effet, ce désordre peut manifester des symptômes assez visibles, comme la formation d'un bourrelet au niveau de la jonction de greffe accompagné de gommoses. De ce fait, il faut bien choisir le porte greffe en tenant compte des caractéristiques de la variété, du sol, et du mode de conduite des arbres (Vigueur) (Pinczon du Sel, 2015).

II.3. Les causes parasitaires (biotiques) :

Le modèle du triangle de la maladie (Schubert *et al.*, 1988), résume les conditions à réunir pour provoquer une maladie chez une plante, à savoir, la présence d'un hôte sensible, d'un agent pathogène, et d'un environnement favorable pour le développement du pathogène.

Une multitude d'organismes sont capables de causer des dommages dans un verger, on distingue les microorganismes : champignons, bactéries et virus, les insectes et nématodes et dans certains cas des mammifères (Grabowski, 2008).

Dans un arbre sain, l'écorce représente une barrière physique étanche protégeant les tissus inférieurs contre toute agression externe. Néanmoins, les plaies provoquées par les cassures de branches, la taille, les blessures physiques (grêle, gel, outils de travail), la cicatrice laissée après la chute des feuilles, représentent toutes des portes d'entrée favorables pour l'installation de pathogènes. Ces derniers, peuvent aussi emprunter les ouvertures naturelles comme les stomates et les lenticelles (Viennot-Bourgin, 1966 ; Spotts *et al.*, 2010). Certains champignons et bactéries disposent de moyens efficaces pour coloniser leurs hôtes ; par exemple, la conidie de *Cladosporium carpophilum* agent de la tavelure du prunier, développe une structure dite appressorium qui pénètre dans le végétale en exerçant une action mécanique (Viennot-Bourgin, 1966).

II.3.1. Les maladies cryptogamiques :

Les champignons représentent la première cause de maladies végétales. La plupart de ces champignons appartiennent au phylum des Ascomycota et Basidiomycota. Quelques maladies telles que les monilioses à *Monilia laxa*, sont fréquentes et redoutables chez les *Prunus*. En plus des dégâts qu'elle cause sur la production (pourriture sur fruits) elle endommage les bouquets floraux et crée des chancres sur bois (dessèchement de branches) (Ogawa, 1995; Petróczy, 2009). La cylindrosporiose (*Blumeriella jappii*), la criblure (*Coryneum beijerinckii*) et la maladie du Plomb (*Chondrostereum purpureum*), sont des maladies moins fréquentes, qui se manifestent principalement avec des symptômes sur feuilles (nécroses, perforations, aspect plombé) (Kohler, 1985), mais l'évolution de ces maladies s'accompagne de mort de jeunes

rameaux, fendillement des branches, déshydratation des tissus ligneux et même la mort de l'arbre.

Les champignons du genre *Phytophthora* (Phylum : Oomycota), sont responsables des pourritures du collet et des racines chez les *Prunus*, généralement l'arbre dépérit et meurt suite à l'interruption de la circulation de sève descendante causée par ce champignon (Lichoux *et al.*, 1990 ; Santini *et al.*, 2006)

Les microorganismes décrits précédemment sont des parasites primaires, qui une fois installés favorisent le développement d'autres organismes dit secondaires (insectes xylophages et champignons lignivores), qui à leur tour, affaiblissent l'arbre même en dehors de la période végétative (Viennot-Bourgin, 1966).

II.3.2. Les maladies dues aux bactéries et phytoplasmes :

Les bactéries représentent la deuxième cause parasitaire de dépérissement après les champignons. Le chancre bactérien est une maladie cosmopolite, provoquée par les bactéries du genre *Pseudomonas* (*P. syringae* et *P. morsporum*) (Ménard *et al.*, 2003). En France le chancre bactérien est à l'origine de dépérissement de vergers entiers. Elles représentent une réelle menace pour les arbres fruitiers dont les *Prunus*, et fait l'objet d'une lutte réglementée en Europe (Gonzalez *et al.*, 2003 ; Lamichhane *et al.*, 2014). Cette pathologie, se reconnaît par un panel de symptômes (mortalité des bourgeons, taches sur feuilles, écoulement gommeux, chancre du tronc qui fini par la mort de l'arbre) (Thomidis and Exadaktylou, 2008).

La galle du collet provoquée par *Agrobacterium tumefaciens*, n'est pas fréquente chez les *Prunus*. Sa présence sur les racines ou le collet empêche la circulation de la sève, ce qui favorise les parasites secondaires, qui induisent un dépérissement progressif. Les bactéries du genre *Xanthomonas* dont l'espèce *X. arboricola* considérée comme organisme de quarantaine, provoquent des dégâts notables sur les *Prunus* (lésions nécrotiques sur feuilles et fruits), ces effet sont rarement létales pour l'arbre (Socquet-Juglard *et al.*, 2013).

Outre les autres types de bactéries, les phytoplasmes appartenant à la famille des Mollicutes sont responsables de certaines maladies graves chez les *Prunus*. L'enroulement chlorotique de l'abricotier (ECA) est causé par un phytoplasme transmis par la cicadelle *Fieberiella florii*. Cette pathologie est très fréquente sur prunier et pêcher et est considérée comme une maladie de quarantaine. Elle induit un débourrement de l'arbre pendant la période de dormance, suivie d'un brunissement de l'écorce et du cambium en été.

Cette pathologie favorise le développement de la rouille et provoque un affaiblissement progressif de l'arbre qui meure au bout de 5ans (Desvignes, 1999).

II.3.3. Les maladies virales :

Les virus sont des parasites intracellulaires stricts, qui se multiplient nécessairement dans une cellule vivante. Pour s'animer, la particule virale mobilise les ressources métaboliques de la cellule hôte pour se répliquer et fabriquer de nouveaux virus (Astier *et al.*, 2001).

Certaines viroses comme le *Cherry virus A* (CVA), ne provoquent pas de symptômes, en revanche ils agissent souvent avec d'autres virus (Little cherry virus 1, Prune dwarf virus) et cette co-infection peut engendrer des symptômes sévères sur l'hôte. Peu d'informations sont disponibles sur ce genre d'interaction. Les viroses ne semblent pas capables de tuer un arbre, mais elles causent une grande perte de production (Šafářová *et al.*, 2013). Cela est le cas du virus de la sharka dit *Plum pox virus* (PPV) en anglais, qui affecte la production des espèces de *Prunus* en rendant les fruits impropres à la consommation (Dallot *et al.*, 2003); il est considéré comme organisme de quarantaine par l'OEPP (Organisme Européen de Protection des Plantes) (Desvignes, 1999 ; OEPP A2 list: No. 96).

Les infections virales sont souvent difficiles à détecter notamment pendant la période de latence. En période d'activité les viroses se reconnaissent par plusieurs symptômes : mosaïques, chloroses, jaunissements, enroulements, panachures et nécroses, selon l'espèce virale. Néanmoins, ces signes ne sont pas souvent évidents et peuvent être confondus avec les symptômes de carences minérales (Kohler, 1985 ; Schubert *et al.*, 1988; Astier *et al.*, 2001).

II.3.4. Les maladies complexes :

En général, on ne peut pas parler de maladie parasitaire sans faire de lien avec une origine physiologique, car les deux facteurs sont étroitement liés. Un déséquilibre physico-chimique dans le sol, peut inciter le développement de microorganismes pathogènes, au dépend de la flore saprophyte, par conséquent provoque l'apparition de maladies complexes, en associant les causes environnementales et parasitaires. Par exemple, il a été rapporté que le chancre bactérien du pêcher est généralement associé aux vergers à sol acide, de même les arbres confrontés au stress hydrique sont prédisposés aux chancres de l'écorce provoqués par les champignons (Vigouroux *et al.*, 1987).

Avant d'envisager une lutte contre un pathogène ou un traitement contre un problème agronomique, il est nécessaire de connaître l'origine du problème. En effet, les causes de dépérissement d'un arbre sont nombreuses et variées, et parfois les symptômes prêtent à confusion. Dans cette démarche, le diagnostic permet d'établir un raisonnement de cause à effet, et s'intéresse à tous les facteurs biotiques et abiotiques en relation avec le développement de l'arbre (Grabowski, 2008).

III. Le diagnostic en pathologie végétale :

III.1. Généralités :

Après le 19^{ème} siècle, la phytopathologie est considérée comme une discipline scientifique à part entière. L'évolution de cette science a commencé par la mise en évidence des principaux pathogènes des plantes à cette époque, dont *Phytophthora infestans* (agent du mildiou) (Matta, 2010), *Claviceps purpurea* (agent de l'ergot des céréales), rouilles du blé, oïdium ...etc (Rapilly, 2001)

La phytopathologie se définit comme étant la science qui étudie les maladies des plantes. Elle s'intéresse aux facteurs biotiques et abiotiques qui induisent les maladies chez les plantes, et aux mécanismes par lesquels ces différents éléments interagissent. Cette discipline permet de mettre en place des méthodes de prévention et de lutte contre ces affections (Lepoivre, 2003). Le diagnostic représente un outil indispensable en phytopathologie. Il est applicable à différents niveaux d'une maladie avec différentes approches. On distingue le diagnostic généraliste, et le diagnostic spécialisé.

III.2. Le diagnostic généraliste :

Le diagnostic généraliste, permet dans un premier temps de caractériser les symptômes (type de symptômes, description – répartition sur l'arbre et dans la parcelle) et d'émettre une hypothèse sur l'origine de la maladie (Communication personnelle, RFSV 2015).

La première étape consiste à faire un relevé visuel sur le terrain. Parfois le diagnostic est posé sur la base des symptômes visibles ou directement sur la présence d'organismes ou de signes de reconnaissances (nid de chenille, pourriture, mycélium, spores, vecteur ...) (Grabowski, 2008). Il faut quant même souligner que l'identification de l'origine d'un symptôme, nécessite une expérience et une bonne connaissance en pathologie végétale : l'espèce végétale, les pathogènes reconnus pour cette espèce, la biologie et le cycle de vie des pathogènes.

Dans ce cas, le constat est délicat et nécessite plus d'informations comme :

- les caractéristiques de la parcelle (exposition au soleil, vent, pluie)
- la structure du sol et les facteurs agronomiques (traitement, amendement, arrosage antécédents cultureaux...)
- la répartition spatiale et évolution de la maladie (localisé, aléatoire ou uniforme)
- description détaillée des symptômes (partie atteinte, aspect, couleur, déformation ...)

En général, les blessures ou dégradations d'origine non parasitaires (grêle, gel, toxicité), sont généralisées sur toute la parcelle ou suivent un axe symétrique (rang, bordure). Dans le cas des maladies parasitaires, la répartition est plutôt dispersée ou en foyer, avec des symptômes évolutifs (Schubert *et al.*, 1988).

Il existe plusieurs outils mis gratuitement à disposition des utilisateurs, comme les sites de diagnostic généraliste, ou les applications développés par l'institut national de la recherche agronomique dont Ephytia. Ces outils facilitent la reconnaissance des symptômes en les comparant à ceux déjà décrits dans les bases de données.

III.3. Le diagnostic au laboratoire:

En pathologie végétale, l'observation visuelle est souvent insuffisante pour déterminer la cause d'un symptôme, et nécessite une confirmation au laboratoire. Cette étape représente une suite complémentaire du diagnostic généraliste. L'étape de détection au laboratoire, peut cibler un groupe de pathogènes potentiels (exemple : champignons ou bactérie), ou un parasite précis (exemple : un genre bactérien ou une espèce).

La recherche d'une maladie ou d'un organisme réglementé doit passer par l'étape de détection, généralement réalisée par un laboratoire agréé et parfois spécialisé dans une pathologie précise.

III.4. Les techniques de détections :

Les techniques de détection dans un diagnostic, sont choisies selon le pathogène recherché, le matériel végétal infecté, le prix et le coût de la méthode. Pour cela, plusieurs techniques de détection sont mises en place par des laboratoires de référence comme l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) en France. Dans le cas des organismes réglementés, l'OEPP (<http://dc.eppo.int>) recommande ou dans certains cas exige l'utilisation de protocoles et techniques mises au point suivant la [norme OEPP](#).

- **Isolement sur milieu de culture :**

L'isolement des agents phytopathogènes sur milieu de culture gélosé, reste l'étape de base souvent utilisée dans le diagnostic des maladies bactériennes et fongiques. L'identification morphologique (sous loupe ou microscope) vient compléter l'étape de culture pour identifier le pathogène, elle nécessite une bonne connaissance de la biologie du pathogène recherché (Kox *et al.*, 2007). Cette technique est qualitative et présente l'avantage d'isoler l'agent pathogène en culture pure, qui peut servir pour des expériences ultérieures plus poussées, comme le postulat de Koch ou dans une éventuelle étude scientifique (étude détaillée du microorganisme ...). Cette procédure présente des limites, car elle est chronophage (durée moyenne de 5 à 10 jours), et ne permet pas la détection d'une grande partie de pathogènes non cultivables (parasites obligatoires). Dans le cas des champignons, la technique de la chambre humide est pratiquée pour cultiver le parasite sur son hôte (oïdium, mildiou ...). La réussite de ce procédé, dépend de la fraîcheur de l'échantillon, et des conditions d'échantillonnage (Schubert *et al.*, 1988). Dans la majorité des cas, cette méthode est complétée par une observation microscopique pour voir la forme et les caractéristiques du parasite. Si les résultats sont insuffisants pour identifier le parasite, une confirmation par biologie moléculaire est nécessaire.

- **Test sur plantes :**

Le postulat de Koch, est l'une des méthodes utilisée depuis le 18^{ème} siècle pour confirmer les hypothèses dans le diagnostic d'une maladie. Elle est utilisée en diagnostic végétale, et se résume en quatre étapes consistant à : 1) Isoler l'agent pathogène à partir de tissu symptomatique ; 2) multiplier le parasite ; 3) inoculer une plante saine avec le parasite ; 4) réisoler le parasite à partir de la plante inoculée qui présente les mêmes symptômes que la plante mère malade. Cette procédure, ne s'applique pas aux parasites non identifiés et difficile à isoler, comme c'est le cas de certains virus (Desvignes, 1999).

Outre le postulat de Koch, l'indexage est une technique assez utilisé pour l'agrément de nouveaux clones, en testant leur sensibilité à certaines maladies. Elle est aussi utilisée dans le diagnostic pour confirmer les symptômes causés par un pathogène donné. Elle est appliquée sur des variétés dites indicatrices sensibles à la maladie étudiée. La plante réceptive est infectée par frottement d'un extrait brut de la plante à indexer, ou avec une solution de pathogène purifié, l'infection est aussi possible par greffage d'un morceau de tissus provenant de la plante malade. Le test est placé dans des conditions optimales pour développer des

symptômes. L'apparition de ces derniers peut s'avérer long, dans le cas des maladies latentes (Devergne *et al.*, 1982 ; Desvignes, 1999).

- **Test sérologiques et enzymatiques :**

Le test ELISA est souvent utilisé dans le diagnostic, notamment pour la détection de pathogènes des grandes cultures ou pour les contrôles phytosanitaires (recommandée par l'OEPP) (López *et al.*, 2010). La technique est simple et pas très onéreuse, elle permet d'obtenir un résultat à partir de broyat de tissus (feuilles, écorce, graine...) et applicables sur la recherche de virus, bactéries ou champignons. Le procédé est basé sur la réaction antigène-anticorps suivie d'une révélation par spectrophotométrie. Cette technique présente quelques limites, comme l'indisponibilité d'anticorps pour certains microorganismes, fuite ou non spécificité de certains anticorps, cela pourrait être lié à l'instabilité des virus. Cette méthode ne fournit pas de résultat probant en cas de faible charge virale (Desvignes, 1999). Une version miniaturisée (kit de détection rapide) fonctionnant sur le principe de l'immuno-chromatographie est disponible sur le marché, il est conçu dans le but de réaliser des détections sur le terrain et d'avoir des résultats dans l'immédiat (virage de couleur). A présent il est disponible chez [Agdia biofords](#) sous le nom de Flashkits® en forme de bandelettes et cible une grande partie des pathogènes des végétaux.

- **Analyses moléculaires :**

La biologie moléculaire est actuellement un outil incontournable dans la détection des parasites en phytopathologie. La PCR est largement utilisée, elle est applicable à tous les organismes et fonctionne même sur des échantillons de faible quantité de matériel. Cette technique est aussi appréciée pour sa rapidité et la possibilité d'analyser plusieurs échantillons à la fois (Kaluzna *et al.*, 2010). L'une des limites de cette technique, est la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon à analyser comme les polyphénols, ce qui nécessite une optimisation lors de l'extraction d'ADN de l'échantillon (López *et al.*, 2010). Dans la majorité des cas, la PCR (ou RT PCR dans le cas de virus à ARN) est insuffisante pour établir un diagnostic complet, donc d'autres techniques sont utilisées, comme le séquençage à haut débit (NGS), suivie par l'analyse bioinformatique (Caporaso *et al.*, 2011). Cette dernière technique, offre la possibilité de déterminer exactement le micro-organisme, et permet d'affiner l'analyse pour identifier l'espèce ou la sous espèce (Šafářová *et al.*, 2013). Dans le diagnostic bactérien, l'analyse RFLP et MLST de l'ADN 16s est parfois nécessaire pour compléter les résultats PCR, par exemple dans le but de déterminer l'espèce ou le pathovar. Cette information est utile pour mettre en place un traitement qui vise spécifiquement le

pathogène identifié. Cette démarche est généralement adoptée dans un contexte de recherche ou de recherche et développement pour améliorer les produits phytosanitaires (fongicides, bactéricides ...) (Gonzalez *et al.*, 2003; Leroux, 2003).

IV. Objectifs du stage :

Ce projet consistait à réaliser un diagnostic dans le but de comprendre l'origine des symptômes de dépérissement observés sur les vergers de pruniers et cerisiers. La complexité de cette mission, réside dans la diversité des paramètres à considérer. Car en plus de la diversité des symptômes (dessèchement de charpentières, noircissement sur troncs, mortalité de rameaux et chancres), les parcelles suivies dans cette étude regroupent des centaines de variétés pour chaque espèce. Notre étude s'intéresse à deux espèces de cerisier : *Prunus avium* et *Prunus cerasus* et une espèce de prunier : *Prunus domestica*.

Dans un premier temps notre diagnostic est basé sur : i) un relevé visuel et un état des lieux dans les parcelles de prunier et cerisier ii) une description fine des symptômes iii) suivie d'hypothèses sur les causes éventuelles des symptômes. Ces hypothèses sont basées principalement sur les observations du terrain, sur une synthèse bibliographique mais aussi sur un retour d'expérience de phytopathologistes (D. Blancard, J. Gaudin, P. Lecompte et T. Ruet).

Dans un deuxième temps, nous avons vérifié les hypothèses en considérant les éventuelles causes environnementales et les causes parasitaires des symptômes observés. Cela a été réalisé en adoptant une logique de cause à effet, en analysant les données des facteurs abiotiques (sol, climat) en relation avec les arbres, suivie d'une analyse d'échantillons au laboratoire pour détecter les agents pathogènes. Enfin, un bilan phytosanitaire a été établi pour émettre les premières préconisations sur l'origine des dépérissements.

I. Description du matériel végétal étudié et des conditions de culture :

L'étude a porté sur deux espèces de cerisier (*Prunus. avium* et *P. cerasus*) représentées par environ 350 cultivars sur l'ensemble des parcelles étudiées et sur le prunier (*P. domestica*) avec 150 variétés. Les portes greffes utilisés sont Jaspi (*P. salicina* x *P. spinosa*) pour les pruniers, Colt (*Prunus avim* x *Prunus pseudocerasus*) et merisier (*P. avium*) pour les cerisiers. Ces variétés proviennent principalement des différentes régions de France mais aussi d'autres pays. Les cerisiers sont classés en 3 catégories de variétés :

- 70% sont des variétés traditionnelles, en général plus rustiques mais souvent sélectionnées pour être adaptées à leur région. 65% de ces variétés sont originaires de France, le reste provenant principalement des USA, Canada, République Tchèque, Allemagne, Hongrie et Italie.
- 10% sont des variétés modernes, moins rustiques, dont 70% sont d'origine étrangère.
- 20% concerne du matériel scientifique utilisé ou créé pour des programmes de recherche. dont 75% sont d'origine française, très majoritairement créés par l'INRA.

Pour les pruniers 90% de la collection est constituée des variétés traditionnelles françaises. La liste des accessions correspondant à chaque variété est disponible sur la base de données des Ressources Génétiques 'URGI [Siregal](#)'.

II. Paramètres à prendre en considération pour le diagnostic des dépérissements :

II.1. Les paramètres agronomiques:

II.1.1. Historique des parcelles :

Les parcelles de ressources génétiques (A, F2, I2 et J2) suivies dans cette étude, sont plantées en rangs à raison de deux arbres par variété.

Afin d'établir un rapport entre les observations et les facteurs environnementaux interagissant directement ou indirectement avec les arbres, nous avons noté les paramètres essentiels reproduisant l'historique de chaque parcelle. Ces facteurs sont : l'année de plantation de chaque arbre, l'apparition et l'évolution de certains symptômes. Les traitements et les méthodes culturales (arrosage, taille, récolte des fruits) appliqués sur les parcelles sont aussi pris en compte.

II.1.2. Qualité du sol et caractéristiques des terrains :

Afin d'obtenir des informations précises sur les caractéristiques du sol correspondant aux zones abritant les arbres dépérissants, nous avons exploité les résultats d'analyse du sol des trois parcelles (A, F2, I2), et le retour d'expérience du chef de culture.

Certains paramètres présentés dans le Tableau 1, nous aiderons à mieux visualiser l'hétérogénéité du sol, et savoir si le sol a un lien avec certains dépérissements.

Tableau 1: Synthèses des caractéristiques agronomiques et pédologiques des cultures suivies au cours de cette étude. La terre est de nature boulbène (majoritairement argileuse). Certaines parcelles sont en pente, et présentent une hétérogénéité de profondeur entre le haut et le bas de la parcelle. Les dates et les conditions de plantations sont différentes pour les arbres d'une même parcelle d'une variété à l'autre.

Parcelle	A	F2	I2	J2
Espèces	<i>Prunus domestica</i>	<i>Prunus avium</i> <i>P. cerasus</i> (5%)	<i>Prunus avium</i> <i>P. cerasus</i> (1%)	<i>Prunus avium</i> <i>P. cerasus</i> (1%)
Années de plantation	2001 (75% de la parcelle) Entre 2002 et 2012 pour le reste	Plantations réparties entre 1994 et 2003	85% entre 2002 et 2004 15% en 2006 et 2007	2003-2004
Porte Greffe	Jaspi GF 8.1 (7 arbres seulement)	Tabel Colt Merisier	Colt	Colt
Nombre d'arbres	273	330	337	161
Pentes	2%	0%	8%	5%
Hétérogénéité	homogène	hétérogène	hétérogène	hétérogène
Texture	Limons-Argile	Limons-Argile	Limons-Argile	/
MO	1,86	1,34	1,58	/
Risque Carence	aucun	Bore	Bore	/
Risque toxicité	Mg échangeable	Mg échangeable	Mg échangeable	/
pH	6,8	6,7	6,9	/
taille	annuelle	Non taillé	Non taillée	Non taillée

II.1.3. Les données météorologiques :

Les événements climatiques, ayant été enregistrés en France ou plus exactement dans la région du Lot et Garonne, sont considérés dans cette démarche. Le but étant de chercher si ces derniers coïncident avec les années de plantation des arbres.

Le site [Météo France](#) nous a servi de référence pour identifier les phénomènes climatiques les plus marquants depuis l'année 1994 qui correspond au début de plantation des parcelles suivies. Pour plus de précisions, les données climatiques de la région Lot-et-Garonne émises

par la station (n° 47038002) de Bourran ont été récupérées sur le site CLIMATIK de l'INRA et analysées.

III. Démarches du diagnostic:

III.1. Diagnostic visuel et état des lieux :

Cette étape consiste à observer l'état général des arbres, et de noter toute malformation, décoloration ou altération. Tous les arbres présentant des marques de faiblesse, ont été identifiés pour suivre l'évolution de leurs symptômes. Un identifiant a été attribué à tous les arbres du domaine, cet identifiant comprend les informations nécessaires pour les localiser facilement, par exemple BA13K : domaine de Bourran, parcelle A, rang 13 et position K. A chaque passage dans les parcelles, les symptômes observés sur chaque arbre sont notés dans une fiche d'observation. Les photos prises des symptômes sont classées par espèce. Les symptômes sont rangés selon la partie de l'arbre atteinte, le type de symptôme (dessèchement, gommose, jaunissement ...) ; ils sont ensuite répartis sur le plan de chaque parcelle (milieu, bordure, foyer ou dispersé).

Cette démarche est adoptée afin d'avoir un premier aperçu sur les causes de dépérissement, quelles soit communes ou différentes, dues à un facteur environnemental (abiotique) ou parasitaire.

III.2. Description des symptômes et hypothèses :

Cette étape du diagnostic est complémentaire de la précédente, et sert à faire le lien entre les observations du terrain et les données scientifiques expliquant la relation de cause à effet dans une maladie végétale. La reconnaissance des symptômes a été réalisée en utilisant des supports en images et des fiches descriptives des maladies reconnues sur *Prunus* (Ephytia, [la clinique des plantes](#), [APS](#), les bases de données de l'[OEPP](#)), et des ouvrages spécialisés (Lichou, 1990 ; Ogawa *et al.*, 1995 ; Durand, 2008). Ces outils décrivent les caractéristiques des maladies, leur origine et les symptômes associés. En plus de la reconnaissance des symptômes via ces outils, en fonction de leur répartition dans les parcelles et sur les arbres, nous avons émis des hypothèses sur les causes des symptômes non identifiés:

Hypothèse 1 : les symptômes sont d'origine abiotique

Hypothèse 2 : les symptômes sont d'origine parasitaire

III.3. Vérification des hypothèses :

La vérification de la première hypothèse est réalisée en référence aux paramètres pédoclimatiques et culturels. Mais n'ayant pas les moyens de vérifier tous les paramètres cités précédemment, cette hypothèse est aussi vérifiée en fonction des résultats obtenus pour la deuxième hypothèse, c'est-à-dire si les symptômes des échantillons analysés ne sont pas causés par un parasite, par élimination ils sont d'origine abiotique.

III.4. Recherche des causes parasitaires :

III.4.1. Echantillonnage :

Les arbres prélevés sont choisis, car ils présentent des symptômes évolutifs et ressemblants à des symptômes décrits dans certaines maladies parasitaires. De plus, ces arbres sont répartis de façon dispersée dans les parcelles.

Les feuilles, tiges, écorces et racines sont prélevées à la jonction entre la zone saine et la zone malade de l'organe symptomatique. En cas de présence d'une maladie, cette zone délimite la progression de l'agent pathogène, donc augmente la possibilité de l'isoler. Afin d'éviter une contamination des échantillons et des arbres prélevés, la lame du scalpel est changée et la lame du sécateur est désinfectée avec une flamme de chalumeau après passage dans l'alcool 70%. Les premiers échantillons ont été réalisés le 5 mai (développement végétatif important), car cette période est favorable au développement des parasites et correspond à l'apparition des symptômes. Les échantillons sont prélevés la veille de chaque analyse pour garder leur fraîcheur, conservés dans du papier absorbant toute la nuit à 4°C.

Les virus donc, comme expliqué en introduction causent rarement des dépérissements. Nous avons centré notre recherche sur les bactéries et les champignons. La détection bactérienne est réalisée au laboratoire de pathologie végétale (UR 407- INRA Avignon) et les champignons au laboratoire santé et agroécologie du vignoble (UMR 1065-INRA Bordeaux).

En tout, 31 échantillons ont été analysés, 7 provenant de pruniers et 24 de cerisiers. 7 échantillons ont fait l'objet des deux analyses (bactériologique et fongique).

III.4.2. Analyses bactériologiques (*Pseudomonas* et *Xanthomonas*) :

Le choix des organismes à rechercher, est réalisé sur la base des symptômes observés qui sont similaires à ceux provoqués par certaines espèces du genre *Pseudomonas* et *Xanthomonas*.

Pour détecter la présence de ces microorganismes, nous avons réalisé des isolements sur milieux de cultures sélectifs de chaque genre bactérien.

- **Isolement sur milieu de culture KBC et YDCA :**

Le milieu King. B avec céphalexin et acide borique comme agents sélectifs (KBC) (Annexe II) a été utilisé pour isoler les bactéries du genre *Pseudomonas*. Les échantillons (feuilles, écorce et racines) ont été rincés à l'eau stérile puis séchés. Ensuite, 8 fragments de tissu d'environ 3mm² ont été prélevés sur la bordure des lésions et déposés sur deux boîtes de pétrie et incubées à 25°C pendant 48h. La même procédure a été réalisée pour détecter la présence de bactéries du genre *Xanthomonas*, en utilisant le milieu YDCA (yeast dextrose calcium agar), recommandé par l'OEPP (Bulletin 36, 2006).

III.4.3. Analyses fongiques :

- **Isolement sur milieu de culture MAC (malt agar avec chloramphénicol) :**

Le milieu de culture utilisé permet d'isoler tout type de champignons et inhibe le développement de bactérie par l'ajout d'antibiotique à large spectre. Les échantillons sont désinfectés en surface dans un bain d'hypochlorite (NaClO 3%) pendant 30s, puis rincés à l'eau stérile pour enlever l'hypochlorite. Dix prélèvements de chaque échantillon ont été inoculés sur deux boîtes de milieu MAC contenant 50mg/L de chloramphénicol (Annexe II), puis incubées à 22°C pendant 4 jours.

- **Observation microscopique :**

Les échantillons ont été observés à la loupe binoculaire (grossissement 1x40) et au microscope optique, avant la mise en culture. Cette observation est réalisée pour chercher des structures indiquant la présence d'un parasite particulier tel que des spores ou mycélium sur la surface des échantillons.

Les mycéliums développés sur le milieu de culture (échantillons positifs), ont été observés au microscope optique, après une coloration au bleu de méthyle. Les paramètres recherchés pour identifier les champignons sont : la forme du mycélium (ramification, cloisonnement) et les structures associées (présence ou pas de sporanges, taille des spores). Ces informations sont ensuite confirmées par les fiches descriptives des champignons parasites (APS Journal, OEPP ; Ogawa *et al.*, 1995). Cette étape de l'analyse est complémentaire avec l'analyse moléculaire.

- **Extraction d'ADN des mycéliums :**

Les cultures ont été repiquées sur un milieu MAC enrichie avec une farine d'avoine (Annexe II) afin d'obtenir un mycélium aérien facile à collecter. Les mycéliums sont ensuite lyophilisés selon le protocole suivant : congélation à -20°C sur la nuit, suivie d'un broyage sous agitation (1300 rpm) avec des billes de verre stériles. L'extraction d'ADN total a été réalisée à partir des lyophilisat suivant le protocole décrit en annexe III. Les concentrations d'ADN sont mesurées par spectrophotométrie. Les échantillons les plus concentrés sont dilués dans l'eau stérile à raison de 100 ng/µl.

- **Amplification de la région ITS par PCR :**

La région ITS de l'ADN ribosomal nucléaire du génome fongique a été spécifiquement amplifiée par PCR en utilisant le couple d'amorces ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG), ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). La PCR a été réalisée dans un volume final de 30 µl en utilisant le mix: tampon PCR (1x), 1,5 mM de MgCl₂, 2 pmol de chaque amorce ITS1 et ITS4, 2 pmol de dNTP, 0,01 U/µl de *Taq* polymérase silver star DNA (Eurogentec).

L'amplification génomique par PCR est réalisée selon le programme suivant : dénaturation 4 min à 94°C, suivie de 38 cycles (dénaturation 40 s à 94°C, hybridation 50 min à 55°C, élongation 1 min à 72°) et une élongation finale 10 min à 72°C.

6 µl dont 4 µl de chaque produit PCR et 2 µl de Z-vision (intercalant de l'ADN), ont été déposés sur un gel d'agarose (1%), puis visualisés sous UV.

- **Séquençage et analyse des séquences :**

Les produits PCR ont été séquencés chez Bekman Coulter Genomics, en utilisant le même couple d'amorces (ITS1/ITS4) que celui utilisé pour l'amplification génomique. Les résultats du séquençage sont alignées sur les bases de données NCBI avec le programme 'Blastn'.

I. Description des symptômes de dépérissement et leur répartition par espèce :

Dans le cadre du diagnostic des dépérissements constatés sur les espèces cerisier et prunier, l'évolution des symptômes a été suivie sur les parcelles entre avril et août 2015. Pour bien caractériser ces symptômes, nous les avons classés en quatre types en fonction notamment de leur localisation sur l'arbre :

Type 1 : Chancres localisés sur tronc (Figure 1-A)

Type 2 : Chancres généralisés sur tronc et branches charpentières (Figure 1-B)

Type 3 : Dessèchement de branches et bourgeons, décolorations localisées de l'écorce et gommoses (Figure 1-C et D)

Type 4 : Chloroses et/ou nécroses sur feuilles et fruits (Figure 1-E et F)

Le mot chancre, regroupe les symptômes de dessèchement, observés sur le bois des arbres (tronc, branches, rameaux). Dans le texte qui va suivre, les symptômes décrit ci-dessus seront désignés avec le terme type 1, type 2, type 3 et type 4.

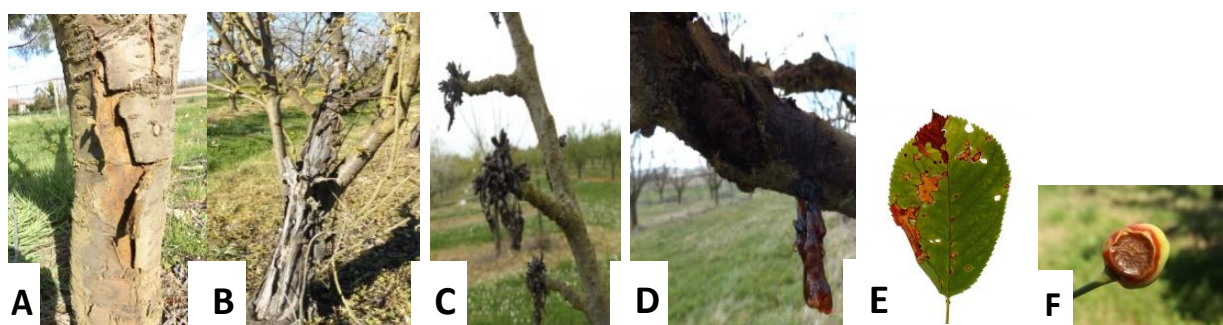


Figure 1: photographies correspondant aux types de symptômes majoritaires, observés sur prunier et cerisier. (A) : éclatement de l'écorce au niveau du tronc de prunier. (B): Chancre sur tronc allant jusqu'aux branches charpentières. (C) : dessèchement de branches et bourgeons (D) chancre sur branche accompagné de gommose. (E), (F) : symptôme de nécrose sur feuille et pourriture sur fruit de cerisier.

Les symptômes de types 4 ne sont pas considérés comme un signe de dépérissement, car ils sont surtout observés sur des arbres non dépérissants. Les valeurs représentées dans le Tableau 2, montrent que le type 1 est supérieur dans la parcelle I2 comparé aux autres. Or le type 2 est le plus fréquent dans les parcelles F2 et J2, et sa prévalence est proportionnelle avec le pourcentage d'arbres morts, ce qui n'est pas le cas de la parcelle de prunier (A). Il faut rappeler que les parcelles F2, I2 et

Tableau 2: Pourcentage d'arbres exprimant les symptômes de dépérissement dans les parcelles de cerisier (F2, I2, J2) et prunier (A).

Symptôme	A	F2	I2	J2
Type 1 (%)	1,4	2	8,3	1
Type 2 (%)	2	18,5	9,8	20
Type 3 (%)	1	15,5	14,5	18
Mort (%)	7,4	12,7	1,5	4,4
Total	11,8	48,3	33,1	43,4

J2 ne sont pas taillées ce qui expliquerait la valeur élevée des symptômes de type 3. Enfin, le total d'arbres dépérissant est considérable sur cerisier, varie de 30% à 50% dans chaque parcelle. La parcelle de prunier présente un total de 11,8% d'arbres touchés dont 7,4 morts,

I.1. Répartition des symptômes sur les parcelles:

La répartition des dépérissements sur l'ensemble des parcelles a été définie afin de suivre l'évolution de chaque type de symptôme dans les parcelles.

Les symptômes observés, sont pour la plupart soit disposés en foyer ou dispersés. Les symptômes de type 1 sont répartis en ligne, le type 2 surtout en foyer, les types 3 et 4 sont plutôt dispersés. Ces données nous ont permis d'établir un lien entre la prévalence des dépérissements et les caractéristiques de chaque parcelle, mais aussi de comparer l'état phytosanitaire des deux espèces suivies : cerisier et prunier.

I.1.1. Dépérissement sur cerisier :

• Parcelle F2 :

Les parcelles de cerisiers sont les plus touchées par les dépérissements. La parcelle F2 représentée dans la Figure 2, montre une répartition en foyer des symptômes de types 1 et 2 (photographie A et B). Les dépérissements de type 2 (photographie A et B) concernent environ 20% des arbres localisés surtout au milieu (sélection rouge), et en bordure de l'allée principale (sélection orange). Les 12,7 % d'arbres morts sont aussi localisés dans ces deux zones. Il faut noter que les symptômes observés au milieu de la parcelle, sont similaires et localisés sur le côté ouest des arbres. Cela est aussi le cas des symptômes en bordure. Dans cette parcelle les dessèchements sur tronc (type 1) évoluent en type 2, souvent accompagnés de la mort de branches charpentières, et à long terme de l'arbre en entier.

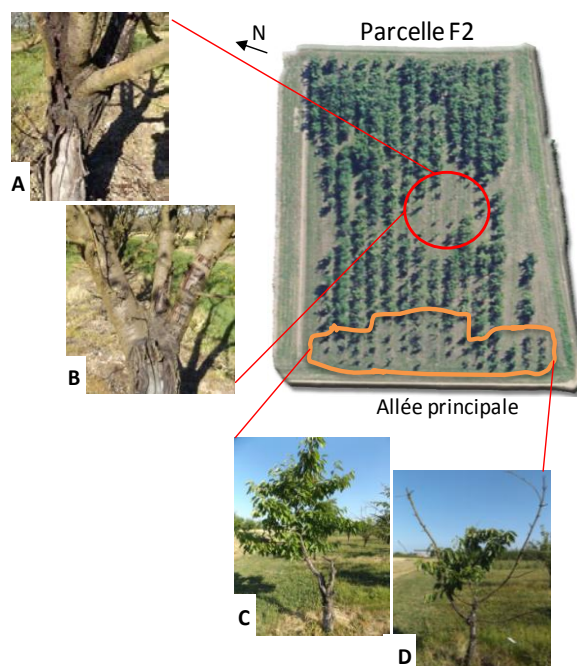


Figure 2: Image satellite présentant la répartition des symptômes de dépérissements dans la parcelle F2 de cerisier. Répartition en foyer des symptômes A et B. Répartition en bordure des symptômes C et D.

• Parcelles I2 et J2 :

Les parcelles I2 et J2 sont en pente, et cela détermine en partie la répartition des symptômes, le type 1 et 2 sont surtout localisés en haut et en bas des parcelles (Figure 3). Les dépérissements observés sur la parcelle J2 sont essentiellement de type 2, localisés dans la zone plate de la parcelle, contrairement à la parcelle I2 dont le pourcentage des deux symptômes sont équivalents. La répartition des arbres morts suit les zones de dépérissements.

Comme pour la parcelle F2, les symptômes retrouvés en bas des parcelles I2 et J2 sont similaires et localisés du côté ouest sur les arbres.

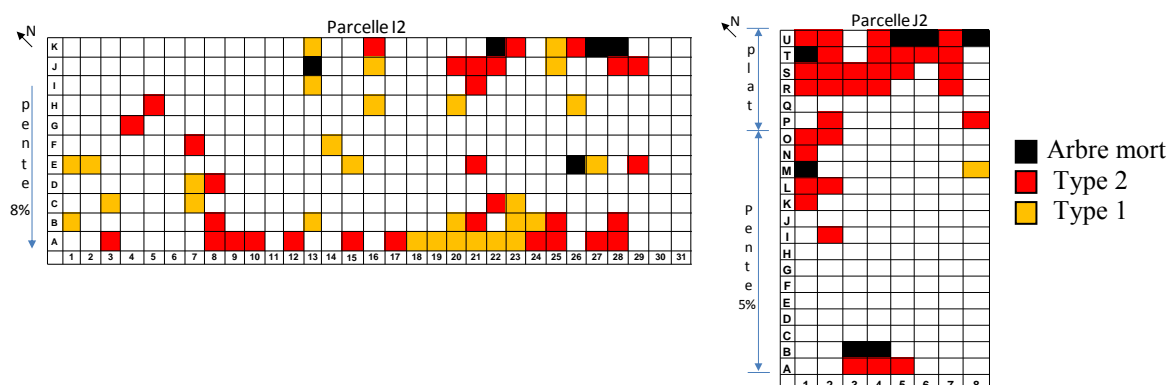


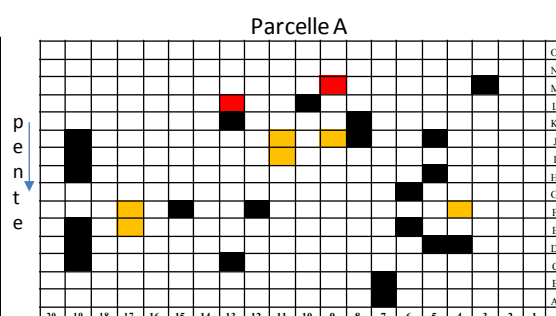
Figure 3: Plans de répartition des symptômes de dépérissement de type 1, type 2 et des arbres morts sur les parcelles de cerisiers I2 et J2 (Plans actualisés le 20-08-2015). La parcelle I2 est en pente d'environ 8%, la parcelle J2 commence par une zone plate et continue en faible pente (5%).

I.1.2. Dépérissement sur prunier :

Les symptômes observés sur prunier sont différents des cerisiers, et sont plutôt dispersés au sein de la parcelle (Figure 4). Par exemple, les éclatements de l'écorce en bas du tronc (type1) sont moins fréquents sur prunier, et engendrent moins de dégâts sur l'état général de l'arbre.

Dans certains cas, les mêmes symptômes sont relevés sur les arbres de la même variété plantés côte à côte, c'est le cas de la variété Saint Jean en position 13K et 13 L. Il faut noter que les arbres dépérissant sur le rang 19 sont morts pendant la saison suivant la plantation.

Figure 4: Plan de la parcelle A montrant la répartition des dépérissements (mis à jour le 21-08-2015). Les arbres dépérissants et les morts sont plus au moins dispersés dans la parcelle. Les arbres des rangs 1 à 17 sont plantés en 2001, les rangs 18,19 et 20 sont plantés entre 2007 et 2012.



Les symptômes de type 1 sont aussi orientés sur pruniers vers le côté ouest de l'arbre, le type 2 et type 3 sont faiblement présents. Les symptômes chloroses foliaires (type 4) ont augmentées à partir de mi juillet.

Le nombre d'arbres morts représente 7,4 % de la parcelle. Nous avons noté dans certains cas, la mort de l'arbre après une courte période symptomatique allant du mois de juin au mois d'août. Dans un premier temps, les feuilles présentent une chlorose suivie d'un brunissement puis par un flétrissement généralisé de l'arbre (Figure 5). Les arbres atteints de ces symptômes sont dispersés dans la parcelle. Ce type de dépérissement n'a pas été observé sur cerisier.



Figure 5: Photographies correspondantes à l'évolution d'un symptôme de dépérissement sur un prunier (*P. domestica*).

La différence de répartition et d'évolution entre les symptômes observés sur prunier et sur cerisier, suggère que l'origine de leurs symptômes est différente.

Compte tenu des symptômes et leur répartition, nous allons dans un premier temps présenter les éléments permettant de tester l'hypothèse 1 : les dépérissements sont d'origine abiotique, et dans un second temps l'hypothèse 2 : les dépérissements sont d'origine parasitaire.

II. Relation entre les facteurs abiotiques et les symptômes de dépérissement (hyp 1):

La vérification de la première hypothèse, s'appuie sur les observations réalisées sur le terrain et les données collectées sur l'historique des parcelles (date de plantations, porte greffe utilisé pour chaque arbre, caractéristiques du terrain). A partir de ces éléments, nous avons établi une liste des causes potentielles de dépérissement comme suit :

II.1. Les facteurs agronomiques (le sol) :

Le but d'inclure ce facteur dans notre étude n'est pas de réaliser un travail d'expert en agronomie, mais d'avoir une vision sur l'homogénéité du sol au niveau de chaque parcelle. Pour ensuite superposer les zones de dépérissement avec les zones homogènes localisées au niveau de chaque parcelle.

Les interprétations qui vont suivre, découlent en partie des observations réalisées sur le terrain, et du profil de résistivité du sol réalisé sur le domaine en 2012 (Figure 6).

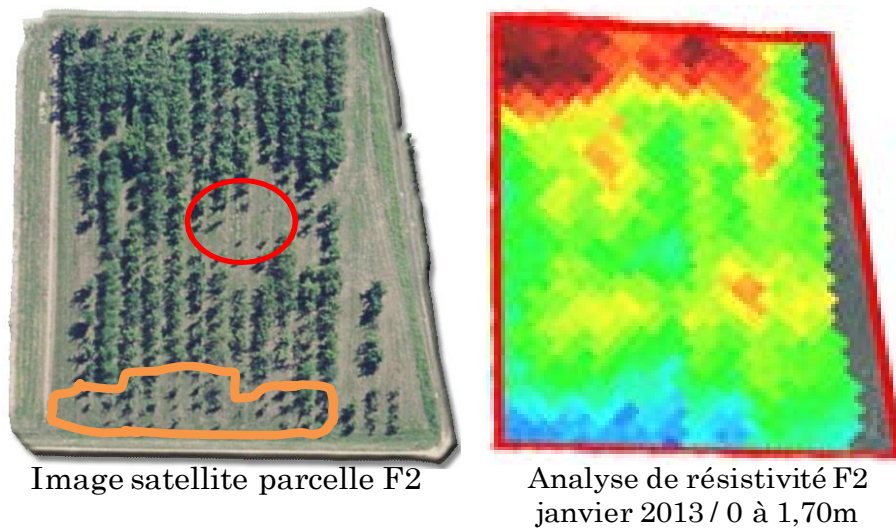


Figure 6 : Comparaison de la répartition des zones de dépérissement sur la parcelle F2 et des résultats d'analyse de la résistivité du sol réalisé sur une profondeur de 0 à 1,70m. La couleur bleu : sol très humide. Verts : sol humide. Jaune : sol moins humide. Rouge : sol faiblement humide.

Les zones de dépérissements représentées dans l'image satellite (sélection orange) correspondent à la zone la plus humide démontré par l'analyse de résistivité du sol (couleur bleu).

D'après le chef de culture, en plus de l'hétérogénéité de l'humidité du sol constatée suite aux analyses de résistivité, la profondeur du sol exploitable par les racines est différente d'un endroit à l'autre au sein des parcelles I2 et J2. En effet, ces paramètres dépendent de la pente de la parcelle qui détermine, le taux de drainage ; certains endroits plats et moins drainants correspondent au zones où les dépérissements d'arbres sont plus fréquents.

La parcelle de pruniers (A) est légèrement en pente et le sol reste globalement homogène en termes de profondeur et d'humidité.

Les caractéristiques physico-chimiques du sol des parcelles suivies sont assez homogènes. Néanmoins, la valeur de Manganèse échangeable, est supérieure à la normale (7,5 mg/kg au lieu de 3,5 mg/kg de terre) dans toutes les parcelles, sauf pour la parcelle J2 dont l'analyse de sol n'a pas été réalisée.

II.2. Le facteur climatique :

Les données climatiques présentées dans le tableau 3, sont récupérées sur le site météo France. Elles sont utilisées pour comprendre la corrélation entre les événements climatiques correspondant aux années de plantation, et l'état phytosanitaire des arbres.

Tableau 3: Evénements climatiques correspondant aux années de plantation de la parcelle F2 de cerisiers

Année de plantation	Arbres morts	Evènement climatique
1994	/	Aucun
2003	8/14	Canicule suivie de sécheresse

Parmi les 14 arbres plantés en 2003 sur la parcelle F2: 8 sont morts, 3 présentent des signes de dépérissement avancé, et 3 seulement sont en bon état. Cependant, les plantations réalisées sur les autres parcelles ne montraient pas d'effet visible suite à cet événement climatique.

III. Les causes parasitaires (biotiques) :

Pour tester la deuxième hypothèse, nous avons réalisé des analyses de détection des pathogènes susceptibles de causer des dépérissements sur les espèces de *Prunus* notamment le cerisier et prunier. Les arbres prélevés sont dispersés dans les parcelles et présentent des symptômes notamment de type 3 et 4, parfois évolutif (voir Annexe IV).

III.1. Résultats des analyses bactériologiques :

Au cours de notre diagnostic, nous avons remarqué des symptômes de type 4 ressemblant à ceux provoqués par les bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Xanthomonas*, cause connue de dépérissements chez les *Prunus* notamment le pêcher. Nous avons donc testé l'hypothèse que ces symptômes soient inféodés au chancre bactérien.

Les résultats d'isolement sur milieux de cultures sont négatifs pour les deux genres bactériens. Ce qui écarte l'hypothèse que ces bactéries soient en cause des symptômes observés sur les arbres analysés (taches nécrotiques sur feuilles, et pourritures des fruits).

III.2. Résultats des analyses fongiques :

Nous avons aussi vérifié si certains dépérissements sont dus à des parasites fongiques. Certains des arbres avérés négatifs en bactériologie, sont prélevés pour l'analyse fongique. Une vingtaine d'échantillons représentatifs des symptômes de type 3 et 4 ont été analysés.

Sept champignons ont été isolés de manière aspécifique, suite à la première étape de détection (milieu de culture généraliste). Le nombre d'inocula positifs par échantillon analysé varie entre 0 et 10 sur 10 (Figure 7). A chaque fois, le mycélium isolé est le même pour les inocula positifs, ce qui monte la pertinence de la méthode de stérilisation à l'hypochlorite, qui évite la contamination des microorganismes de surface (saprophytes).



Figure 7: Exemple de résultat de l'analyse fongique obtenu après isolement sur milieu de culture MAC.

L'observation microscopique, étant insuffisante pour confirmer l'identité des champignons isolés, nous avons extrait l'ADN à partir des mycéliums afin de réaliser une analyse moléculaire. Les résultats d'extraction des ADN mycéliens sont présentés dans le Tableau 4.

Tableau 4: Concentrations des ADN extrait à partir de mycéliums. Les échantillons portant la mention (carpo) signifient que l'ADN a été extrait à partir de carpophore.

Echantillon	(ng/μl)	DO 260/680	DO 260/230
E8-1	307.84	2.03	1.61
E8-2	84.11	2.10	1.97
E11	451.24	2.13	2.08
E13	149.16	2.19	2.29
E14-1	274.82	2.11	2.03
E14-3	236.99	2.12	2.09
E15-1	1587.37	2.16	2.25
E15-1carpo	436.33	2.04	1.94
E15-2	184.08	2.16	1.95
E15-2carpo	136.94	2.17	2.07
E16	162.76	2.12	1.82
E16 carpo	287.07	1.92	1.43
E17	235.74	2.07	1.90

Les quantités d'ADN extraits sont satisfaisantes et de bonne qualité. Il faut noter que la quantité d'ADN obtenue pour l'échantillon E15 est nettement supérieure en utilisant le mycélium (E15-1) que le carpophore (E15-1 carpo). Cela n'est pas le cas pour les échantillons E15-2 et E16, pour lesquelles la quantité d'ADN extrait à partir de mycélium et carpophore est équivalente.

Ces ADN sont utilisés comme matrice pour réaliser une PCR ciblant la séquence ITS de l'ADN ribosomal de chaque mycélium. Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure 8.

La taille des amplifications correspondent à la taille attendue (environ 500pb), avec plus ou moins 20 pb, en fonction de l'échantillon. Les tailles des bandes correspondant à l'échantillon E14 laissent penser que le mycélium isolé est le même sur feuille (E14-1) et sur fruits (E14-3).

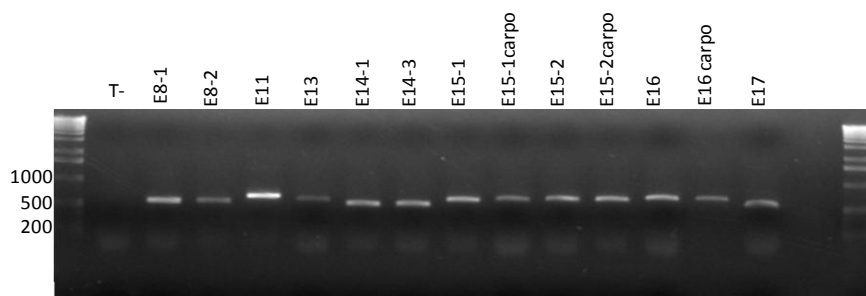


Figure 8: Profils de migration des produits PCR amplifiés avec les amorces spécifique des séquences ITS, réalisé sur ADN génomiques extrait séparément de 13 mycéliums.

Les produits PCR ont été séquencés, et alignés sur la base de données NCBI. Les organismes identifiés suite à l'analyse des séquences sont présentés dans le Tableau 5.

Les deux genres bactériens *Pseudomonas* et *Xanthomonas* n'ont pas été détectés dans les échantillons analysés. Les résultats de l'analyse fongique montrent trois échantillons négatifs (E3, E4 et E10) et sept positifs (E1, E5, E11, E14, E15, E16 et E17). Ces derniers montrent la présence surtout de champignons saprophytes. Néanmoins, certains d'entre eux tel que *Stereum hirsutum*, sont décrits sur des arbres dépérissant et provoque la pourriture blanche du bois, c'est-à-dire qu'ils peuvent passer de la vie de saprophyte à la vie de parasite opportuniste.

Le champignon *Discostroma fuscillum* a été décrit par (Bain *et al*, 2012) comme pathogène sur pommier. A ce jour, aucune référence scientifique n'a démontré un effet pathogène de ce microorganisme sur les espèces de *Prunus*.

Le champignon *Phoma macrostoma* a été décrit comme pathogène de pommier et fraisier, mais non reconnu comme pathogène sur *Prunus*. Les résultats d'analyses des échantillons E20, E22, E32, E33 et E34 sont en attente.

Tableau 5: Bilan des analyses bactériologiques et fongiques réalisées sur une trentaine d'échantillons prélevés sur prunier et cerisier : la détection des bactéries du genre *Pseudomonas* et *Xanthomonas* est négative pour tous les échantillons. Les champignons détectés sont majoritairement des saprophytes. NA : non analysé

ID arbre	N° échantillon	Résultat		mode de vie des champignons
		<i>Pseudomonas</i> <i>Xanthomonas</i>	champignons	
BA13K	E1	Négatif	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Discostroma fuscillum</i>	- Saprophyte - Pathogène de pommier
BA11G	E2	Négatif	NA	
BA9J	E3	Négatif	Négatif	
BI2-24H	E4	Négatif	Négatif	
BI2-27F	E5	Négatif	<i>Trametes versicolor</i>	Saprophyte /Lignivore bois mort
BF2-13X	E6	Négatif	NA	
BF2-12W	E7	Négatif	NA	
BA3M	E10	NA	Négatif	
BA9M	E11	NA	<i>Abortiporus biennis</i>	Saprophyte/ Pourriture bois mort
BF2-8U	E15	NA	<i>Trametes versicolor</i> <i>Stereum hirsutum</i>	Saprophyte /Lignivore Pourriture du bois mort
BF2-9M	E16	NA	<i>Trametes sanguinea</i>	Saprophyte /bois mort
BF2-10X	E17	NA	<i>Phoma macrostoma</i>	Pathogène endophyte du pommier/ non reconnu sur prunus
BF2-8I	E14/E18	Négatif	<i>Phoma macrostoma</i>	
BF2-7U	E19	Négatif	NA	
BF2-7V	E20	Négatif	En cours	
BF2-10W	E21	Négatif	NA	
BF2-12W	E22	Négatif	En cours	
BF2-13X	E23	Négatif	NA	
BJ2-8O	E24	Négatif	NA	
BI2-23H	E25	Négatif	NA	
BJ2-6T	E26	Négatif	NA	
BF2-8E	E32	NA	En cours	
BF-Bas	E33	NA	En cours	
BA-3O	E34	NA	En cours	

I. Intérêt du travail mené lors de cette étude :

Le travail que nous avons effectué visait à déterminer les causes potentielles des dépérissements constatés sur cerisier et prunier durant les dernières années au sein du domaine expérimental INRA de Bourran. Afin d'identifier les symptômes observés nous avons adopté une stratégie qui s'inscrit dans le cadre d'un diagnostic. Ce dernier a été réalisé en deux parties : la première partie repose sur un relevé visuel sur le terrain afin d'établir un état des lieux, suivie d'une étape de formulation d'hypothèses concernant la ou les causes possible des symptômes observés. Dans ce cas, nous avons émis deux hypothèses : i) les dépérissements ont une origine environnementale, et ii) ces symptômes ont une origine parasitaire. La deuxième partie du diagnostic était de vérifier les deux hypothèses par l'analyse des données recueillies, suivie d'une détection au laboratoire des parasites (champignons et bactéries) qui pourraient être impliqués dans les dépérissements.

II. Eléments de vérification de la première hypothèse (les dépérissements sont d'origine abiotique) :

La première étape du diagnostic, nous a permis de mettre en évidence les symptômes de dépérissement, et leur répartition dans chaque parcelle. Ce dernier point montrait des regroupements de symptômes de dépérissement foyer, notamment en bordure des parcelles. Le premier facteur est le sol dont on distingue des zones très humides en hiver. De plus, la texture du sol (majoritairement limon-argileuse) ne facilite pas l'infiltration de l'eau et le drainage. Ces éléments pourraient être cause d'asphyxies racinaires, mais cette hypothèse n'était pas vérifiable dans le cadre du stage. Néanmoins les porte greffe Colt et Jaspi sont choisis pour leur adaptation aux sols humides.

Le deuxième facteur est le climat. En effet la mort de 8 cerisiers sur 14 plantés en 2003 n'est pas une simple coïncidence. Les données climatiques de météo France, indiquent que l'été 2003 est le plus chaud jamais observé depuis 1950. La canicule a duré du 1 au 15 août suivie d'une période de sécheresse. Les températures enregistrées par la station climatique de Bourran (n° 47038002) étaient exceptionnellement élevées sur une si longue période, avec un pic de température de 41.3°C le 4 août 2003. De plus l'écart de température enregistré pendant cette période a atteint 22.5°C. Ce changement brusque entre la nuit et le jour peut être une cause directe de certains éclatements sur tronc. En plus de l'écart de température l'exposition au soleil des arbres de bordure, explique la disposition linéaire des symptômes de type 1 en bordure des parcelles.

Les variétés de prunier et cerisier soit présentent qu'en deux clones par variété planté en contigus. Par conséquent nous n'avons pas pu vérifier l'hypothèse que la sensibilité variétale soit impliquée dans l'apparition de certains désordres liés à un manque d'adaptation de l'arbre.

III. Eléments de vérification de la deuxième hypothèse (les dépérissements sont d'origine parasitaire) :

Les analyses réalisées pour tester cette hypothèse, montrent une absence d'infection bactérienne à *Pseudomonas* et *Xanthomonas*. De plus, certains champignons majoritairement saprophytes ont été isolés. Ces derniers ne sont pas en mesure de s'installer sur un arbre sain, mais dans des conditions favorables (chancre, plaies, bois mort), ils s'installent et peuvent accentuer les symptômes et participent au dépérissement de l'arbre. Cela est le cas des basidiomycètes tels que *Trametes versicolor*, retrouvé sur plusieurs parcelles. Ce dernier a un arsenal enzymatique capable de dégrader la lignine, et provoque la pourriture du bois parfois suivie de dessèchements progressifs des autres parties aériennes de l'arbre (Dilley, 1981).

Le champignon *Phoma macrostoma*, isolé sur deux cerisiers présentant des nécroses sur feuilles et fruits, est un agent pathogène avec un large spectre d'hôte. Il a été démontré artificiellement que *P. macrostoma* provoque des dégâts sur la fraise (famille des Rosaceae) (Bailey et al., 2011). A présent il n'a pas été reconnu comme pathogène sur les espèces de *Prunus*. Mais le fait de l'isoler sur deux cerisier de variétés différentes, pourrait suggérer la sensibilité de ces dernières vis-à-vis de ce pathogène. En complément à ces données, des études plus poussées sont à envisager afin de tester in vivo l'impact de ce microorganisme sur un plant de cerisier sain.

L'analyse fongique de cinq échantillons destinée au laboratoire (vegepolys) est en attente. Les résultats de cette analyse pourront nous apporter de nouvelles réponses par rapport aux causes de dépérissement.

IV. Conclusion sur l'origine la plus probable des dépérissements :

Lors de cette étude nous avons pu identifier : i) des zones avec un faible drainage, très humides en hiver, où l'on retrouve la grande majorité des arbres dépérissant et ii) des zones en pente, plus drainantes et moins humides avec un faible taux de dépérissement. Ce cas de figure concerne notamment les parcelles de cerisier (F2, I2 et J2). La répartition des symptômes et les données pédoclimatiques suggèrent que la grande majorité des dépérissements constatés sur le domaine, sont d'origine abiotique. Afin d'appuyer ce résultats,

des analyses plus poussées sont envisageable, comme la réalisation d'un profil du sol, l'amélioration de la texture du sol avec un apport de fumure.

Cette conclusion n'écarte pas l'implication du facteur parasitaire dans l'accélération du phénomène de dépérissement des arbres. La cause parasitaire est considérée comme secondaire. Cela a été confirmé par l'absence d'organismes pathogènes dans les échantillons analysés. Les champignons détectés sont majoritairement saprophytes et lignivores avec. Il convient de préciser que l'un des arbres (BF2-10X) à partir duquel le champignon *Phoma macrostoma* a été isolé, ne présente pas de signe de dépérissement, des nécroses sur feuilles et fruit sont les seules symptômes observés. Ni ces observations, ni la littérature ne nous permettent de savoir si ce microorganisme pourrait causer le dépérissement de l'arbre dans le futur. Cependant, cet arbre nécessite un traitement adapté et un suivi au cours de l'année prochaine.

Les trois cas de morts brutales constatées sur prunier, seraient dus à des parasites, car ces arbres présentaient des symptômes évolutifs, et répartis aléatoirement sur les parcelles. De plus les arbres adjacents ne présentaient pas de symptôme de dépérissement. Par exemple il a été rapporté (Liste A2 OEPP: n° 146) que les pruniers atteints de l'enroulement chlorotique de l'abricotier (ECA), sont prédisposés à la rouille du prunier (*Tranzschelia pruni*), et cette association de pathogènes est capable de défolier l'arbre pendant la période végétative, donc pourrait accélérer sa mort. Il faut rappeler que les analyses de détection de l'ECA sont réalisées annuellement au sein de l'UEA, mais les arbres morts brutalement pendant mon stage n'ont pas présentés de symptômes spécifiques à la maladie de l'ECA.

Compte tenu des arguments formulés pour chaque hypothèse, nous pouvons conclure que les facteurs environnementaux sont la principale cause de dépérissement constaté au cours de cette étude. La cause parasitaire vient accentuer le dépérissement et dégrade l'état phytosanitaire des arbres.

V. Analyse critique du dispositif cultural et perspective d'amélioration :

Lors de ce diagnostic, nous avons constatés certaines faiblesses liées au terrain et aux pratiques culturales notamment :

- Affaiblissement des arbres et non renouvellement sur une longue période, allant jusqu'à 20 ans. Ce premier point pourrait être expliqué par le fait que ces vergers représentent à la fois un support pour la recherche et une collection variétale, donc la plantation a pour objet la conservation de longue durée. longtemps.

- La présence de branches mortes sur les arbres, représente un habitat favorable pour les parasites secondaires (champignons lignivores, insectes xylophages etc...). En effet, certaines parcelles ne sont pas taillées car elles font l'objet d'un suivi phénotypique.
- Le reste des fruits sur les arbres (momies) représente un réservoir à pathogènes qui se conserve même en hiver. Il est évident que les fruits produits par les parcelles de ressources génétiques n'ont pas une grande valeur commerciale, car toutes les variétés sont différentes et la qualité comme la quantité des fruits sont souvent incompatibles aux exigences du marché. Actuellement, une démarche de valorisation de ces fruits est en cours, des échantillons de fruits sont envoyés pour tester la possibilité de les transformer en jus. Cette procédure est très positive dans le sens où ça améliore l'état phytosanitaire des arbres, en diminuant l'incidence de pathogènes notamment *Monilia laxa*.
- La présence de plusieurs variétés différentes au sein de la même parcelle et recevant les mêmes traitements, présente une contrainte forte si on prend en compte les exigences pédoclimatiques et le comportement physiologique de chaque variété. En effet, ce facteur est important car certaines variétés sont plus sensibles que d'autres envers l'environnement ou les agents pathogènes, par conséquent elles nécessitent un traitement adapté. Malgré le fait que les traitements, la taille et l'arrosage sont appliqués suivant un calendrier bien précis, ils ne conviennent pas à une parcelle multi-variétale. Il est important de considérer les caractéristiques physiologiques de chaque variété dont la montée de sève, la date de débourrement et les exigences hydriques afin d'optimiser la plantation.
- La texture du sol (argilo-limoneux) et le manque de drainage de certains endroits, semble asphyxiants et donc entraîne le dépérissement des arbres à long terme. Il conviendrait d'améliorer le drainage des parcelles en réalisant des fossés en bordure.

Dans la suite de ce travail, il serait intéressant de prendre contact avec l'unité SAVE, afin d'intégrer le projet Ephytia. Cette base de données est un outil d'aide au diagnostic développé sur ordinateur et Smartphone afin de faciliter l'envoi de données depuis le terrain.

Cette démarche a été entamée avec le responsable du projet (Dominique Blancard) pour créer un espace dédié aux maladies des *Prunus*. Cet outil apportera une valeur ajoutée au travail réalisé à l'UEA et facilitera le suivi phytosanitaire des parcelles. Cette application offre la possibilité d'organiser l'information selon l'espèce végétale, et permet de classer les symptômes et faire un suivi spatiotemporel grâce à la fonction de localisation GPS. Cette perspective représente une suite du travail mené lors de notre étude.

Références Bibliographiques :

Articles scientifiques :

Bailey, K.L., Pitt, W.M., Falk, S., and Derby, J. (2011). The effects of *Phoma macrostoma* on nontarget plant and target weed species. *Biol. Control* 58, 379–386.

Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., and Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 4516–4522.

Cousin, M.T. (1995). Phytoplasmes et phytoplasmoses. *Agronomie* 15, 245–264.

Dallot, S., Gottwald, T., Labonne, G., and Quiot, J.-B. (2003). Spatial pattern analysis of Sharka disease (Plum pox virus strain M) in peach orchards of southern France. *Phytopathology* 93, 1543–1552.

Devergne, J.-C., Cardin, L., and Bontemps, J. (1982). Indexages biologique et immunoenzymatique (ELISA) pour la production d'oeillets indemnes de virus de la marbrure (CarMV). *Agronomie* 2, 655–666.

Gilani, S.A., Qureshi, R.A., Khan, A.M., and Potter, D. (2013). A molecular phylogeny of selected species of genus *Prunus* L.(Rosaceae) from Pakistan using the internal transcribed spacer (ITS) spacer DNA. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 4867–4872.

Gonzalez, A.J., Rodicio, M.R., and Mendoza, M.C. (2003). Identification of an Emergent and Atypical *Pseudomonas viridiflava* Lineage Causing Bacteriosis in Plants of Agronomic Importance in a Spanish Region. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2936–2941.

Grabowski, M. (2008). Plant Pathology. Horticulture for the Home & Garden. University of Minnesota Extension. HORT 1003, Item #08602.

Kaluzna, M., Ferrante, P., Sobiczewski, P., and Scortichini, M. (2010). Characterization and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* from stone fruits and hazelnut using repetitive-PCR and MLST. *J. Plant Pathol.* 781–787.

Kohler, F. (1985). Agents pathogenes et maladies physiologiques des plantes cultivees en Nouvelle Calédonie et aux îles Wallis et Futuna (Centre ORSTOM).

Kox, L.F.F., van Brouwershaven, I., van de Vossenbergh, B., van den Beld, H., Bonants, P.J.M., and Gruyter, J. de (2007). Diagnostic values and utility of immunological, morphological, and molecular methods for in planta detection of *Phytophthora ramorum*. *Phytopathology* 97, 1119–1129.

Lamichhane, J.R., Varvaro, L., Parisi, L., Audergon, J.-M., and Morris, C.E. (2014). Disease and Frost Damage of Woody Plants Caused by *Pseudomonas syringae*. In *Advances in Agronomy*, (Elsevier), pp. 235–295.

Leroux, P. (2003). Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. *C. R. Biol.* 326, 9–21.

López, M.M., Roselló, M., and Palacio-Bielsa, A. (2010). Diagnosis and detection of the main bacterial pathogens of stone fruit and almond. *J. Plant Pathol.* S57–S66.

- Matta, C. (2010). Spontaneous Generation and Disease Causation: Anton de Bary's Experiments with *Phytophthora infestans* and Late Blight of Potato. *J. Hist. Biol.* 43, 459–491.
- Ménard, M., Sutra, L., Luisetti, J., Prunier, J.P., and Gardan, L. (2003). *Pseudomonas syringae* pv. *avii* (pv. nov.), the causal agent of bacterial canker of wild cherries (*Prunus avium*) in France. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 565–576.
- Petróczy, M.H. (2009). Appearance of *Monilinia fructicola* and *Monilia polystroma* in hungary and newer possibility of the protection. Doctoral School of Horticultural Science. Corvinus University, Budapest.
- Rapilly, F. (2001). Champignons des plantes: les premiers agents pathogènes reconnus dans l'histoire des sciences. *Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences-Series III-Sciences de La Vie* 324, 893–898.
- Rapilly, F. (2001). Champignons des plantes: les premiers agents pathogènes reconnus dans l'histoire des sciences. *CR Acad Sci Paris, Sciences de la vie/ Life Sciences* 324: 893-898.
- Šafařová, D., Navrátil, M., Paprštejn, F., Candresse, T., Marais, A. (2013). Cherry virus A infecting cherries and plums in the Czech Republic - Short communication. *Hort. Sci.* 40, 37-39.
- Santini, A., Biancalani, F., Barzanti, G.P., and Capretti, P. (2006). Pathogenicity of four *Phytophthora* species on wild cherry and Italian alder seedlings. *Journal of Phytopathology* 154, 163–167.
- Schubert, T.S., Breman, L.L., and Walker, S.E. (1988). Basic concepts of plant disease and how to collect a sample for disease diagnosis. *Plant Pathol. Circ. Dep Agric. Consum. Serv. Div Plant Ind.*
- Socquet-Juglard, D., Kamber, T., Pothier, J.F., Christen, D., Gessler, C., Duffy, B., and Patocchi, A. (2013). Comparative RNA-Seq Analysis of Early-Infected Peach Leaves by the Invasive Phytopathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. *PLoS ONE* 8, e54196.
- Spotts, R.A., Wallis, K.M., Serdani, M., and Azarenko, A.N. (2010). Bacterial canker of sweet cherry in Oregon-infection of horticultural and natural wounds, and resistance of cultivar and rootstock combinations. *Plant Dis.* 94, 345–350.
- Thomidis, T., and Exadaktylou, E. (2008). Susceptibility of 30 cherry (*Prunus avium*) genotypes to the bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 36, 215–220.
- Vigouroux, A., Berger, J.-F., and Bussi, C. (1987). La sensibilité du pêcher au dépérissement bactérien en France: incidence de certaines caractéristiques du sol et de l'irrigation. Relations avec la nutrition. *Agronomie* 7, 483-495.

Ouvrages :

Astier, S., Albouy, J., Maury, Y., Lecoq, H. (2001). Principes de virologie végétale : génome, pouvoir pathogène, écologie des virus. Paris, FRA : INRA Editions.

Desvignes, J-C. (1999). Jean-Claude DESVIGNES 1999. Maladies à virus des arbres fruitiers, CTIFL, isbn 9782879111223, 15-16.

Durand, R. (2008). Champignons des arbres et du bois (les principaux pathogènes). Chatillon coligny (45).

Lepoivre, P (2003). Phytopathologie: Bases moléculaires de biologie des pathosystèmes et fondement des stratégies de lutte; De Boeck Université: Bruxelles, Belgique pp 9–11.

Lichou, J., Edin, M., Tronel, C., Saunier, R. (1990). Le cerisier. La cerise de table. Paris, FRA : CTIFL.

Ogawa, J. M., Zehr, E. I., Bird, G. W., Richie, D. F., Urio, K., and Uyemoto, J. K. (1995). Compendium of Stone Fruit Diseases. eds. American Phytopathological Society Press, ISBN 0890541744.

Pinczon du Sel, S. (2015). Le porte-greffe du cerisier du vigoureux au nanisant. La cerise- Matériel végétal. 3^{em} édition. Domaine Expérimental La Tapy.

Viennot-Bourgin, G. (1966). Les champignons parasites des arbres fruitiers à pépins. Edition Maurice PONSOT, Paris.

Sites consultés:

Liste A1 OEPP: n° 137 & n° 166: <http://www.eppo.int> consulté le 16-08-2015

Apricot chlorotic leafroll phytoplasma. Liste A2 OEPP: n° 146. Consulté le 20-08-2015

APS Journals: <http://apsjournals.apsnet.org/toc/pdis/99/4>

Clinique des plantes: <http://www.cliniquedesplantes.fr>

Agdia biofords: <https://orders.agdia.com/inventory.asp?CatId={F1318887-2A51-4D12-8536-1C011C04AAC8}> consulté le 30-07-2015

PHYTOMA: http://www.phytoma-ldv.com/article-23245-Bilan_phytosanitaire_des_cultures_fruitieres_en_2003_Le_climat_plus_nuisible_que_les_pestes_10/08/2015 consulté le 15-07-2015

URGI/ Siregal : <https://urgi.versailles.inra.fr/siregal/siregal/grc.do> consulté le 11-08-2015

Annexe I : plan du domaine de la tour de rance. Les parcelles marquées avec un point jaune ont fait l'objet du suivie réalisés lors de cette étude. Les parcelles de cerisiers en Rouge et la parcelle de prunier en violet.



Annexe II : Milieux de culture**KBC:**

K ₂ PO ₄	1,5g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1,5g
Protéose peptone	12g
Glycérol	10ml
Agar	15g
H ₂ O qsp	900ml

Autoclaver séparément :

H ₃ BO ₃	1,5g
H ₂ O	100ml

Rajouter 200mg de Cycloheximide (Antifongique) et 80mg de Céphalexine (Antibiotique).

YDCA (yeast dextrose calcium agar):

Extrait de levure	10.0 g
Glucose	20.0 g
Carbonates de calcium	20.0 g
Agar	15.0 g
H ₂ O stérile qsp	1.0 L

MAC (Malt Agar avec chloramphénicol (1L)

Malt	15g
Agar	15g
Autoclaver pendant 2h puis rajouter l'antibiotique.	
Chloramphénicol	50mg

Avoine avec chloramphénicol (1L)

Farine d'avoine	40g
Agar	20g
Eau	QSP 1L
Chloramphénicol	50mg/L

Annexe III : protocole d'extraction d'ADN génomique à partir d'un mycélium

Les mycéliums extraits sur boîtes de pétries sont lyophilisés

- Conservés à -20°C pendant la nuit
- Le mycélium est réduit en poudre en utilisant des billes de verre stériles en agitant 2 min à

Extraction d'ADN :

- 1- Préchauffer le tampon d'extraction (AB ou CTAB X 1) à 65°C
- 2- Broyer l'échantillon lyophilisé (avec des billes de verre)
- 3- Ajouter 600µl de tampon à 65°C
- 4- Agiter rapidement et incuber au bain marie à 65°C au minimum 1h (agiter énergiquement les tubes toute les 10 minutes environ)
- 5- Ajouter 400µl de **chloroforme-isoamylalcool** et agiter doucement pendant 5 à 10 minutes par retournement régulier.
- 6- centrifuger les tubes 10 min à 13000 rpm à 4°C puis transférer le surnageant dans un tube propre.
- 7- Ajouter 2/3 d'isopropanol (2-isopropanol) et agiter pendant 10 minutes.
- 8- Laisser précipiter à -20°C pendant au moins 2 heures.
- 9- Centrifuger 10 min à 13000rpm à 4°C, éliminer le surnageant, rincer le culot avec 800 µl d'éthanol (70%) et centrifuger 10 min à 13000rpm.
- 10- Eliminer le surnageant, faire sécher le culot d'ADN (environ 1h à T° ambiante)
- 11- Reprendre le culot dans 50-100µl d'eau stérile en mélangeant délicatement (up & down).
- 12- Mesurer la concentration et la qualité de l'ADN obtenue (rapport 260/280) au nanodrop.
- 13 : Conserver l'ADN à 4° si utilisé rapidement si non à -20 pour une meilleur conservation.

Annexe IV : liste des échantillons analysés pour la détection bactérienne et fongique.

ID	N° échantillon	Organe symptomatique	Date de prélèvement	Espèce	Observations
BA13K	E1	Ecorce, Branche Feuilles	10/05/2015	<i>P. domestica</i>	Arbre mourant, boursouflures gommoses, dessèchement
BA11G	E2	Écorce	10/05/2015	<i>P. domestica</i>	Taches noirs sur tronc et branches charpentières
BA9J	E3	Écorce	10/05/2015	<i>P. domestica</i>	Taches brunes commençant du collet
BI2-24H	E4	Écorce Feuilles	10/05/2015	<i>P. avium</i>	Nécroses sur feuilles
BI2-27F	E5	Feuilles	10/05/2015	<i>P. avium</i>	Chancre sur tronc, nécroses sur feuilles
BF2-13X	E6	Feuilles Fruits	10/05/2015	<i>P. avium</i>	Nécroses sur feuilles et fruits
BF2-12W	E7	Feuilles et Fruits	10/05/2015	<i>P. avium</i>	Nécroses sur feuilles et fruits
BA13K	E8	Ecorce, Branche Feuilles	28/05/2015	<i>P. domestica</i>	Arbre mourant : boursouflures, gommoses, dessèchement, flétrissement
BA9J	E9	Ecorce	28/05/2015	<i>P. domestica</i>	Taches brunes commençant du collet
BA3M	E10	Racines	06/05/2015	<i>P. domestica</i>	Arbre mort subitement il y a 6 mois, arraché, racines pourris
BA9M	E11	Racines	06/05/2015	<i>P. domestica</i>	A moitié mort, racines noircis en surface et pourriture blanche
BI2-24H	E12	Feuilles	28/05/2015	<i>P. avium</i>	Taches brunes sur feuilles
BI2-27F	E13	Feuilles Ecorce	28/05/2015	<i>P. avium</i>	Chancre sur tronc, taches nécrotiques sur feuilles
BF2-8I	E14	Feuilles Fruits	28/05/2015	<i>P. avium</i>	Taches brunes sur feuilles, et fruits
BF2-8U	E15	Carpophore Feuilles	28/05/2015	<i>P. avium</i>	Carpophore sur tronc, nécroses sur feuilles
BF2-9M	E16	Carpophore	28/05/2015	<i>P. avium</i>	Carpophore de couleur orange, pourriture du tronc
BF2-10X	E17	Feuilles Fruits	28/05/2015	<i>P. avium</i>	Tronc sain, taches nécrotiques sur feuilles, monilia sur fruits
BF2-8I	E18	Feuilles	8/06/2015	<i>P. avium</i>	Chancre sur tronc et gommose, taches sur feuilles
BF2-7U	E19	Feuilles	8/06/2015	<i>P. avium</i>	Tronc sain, nécroses sur feuilles
BF2-7V	E20	Feuilles	8/06/2015	<i>P. avium</i>	Nécroses amorphes sur feuilles
BF2-10W	E21	Feuilles	8/06/2015	<i>P. avium</i>	Tronc sain, nécroses sur feuilles et fruits
BF2-12W	E22	Feuilles	8/06/2015	<i>P. avium</i>	Nécroses sur feuilles et pourriture sur fruits
BF2-13X	E23	Feuilles	8/06/2015	<i>P. avium</i>	
BJ2-8O	E24	Feuilles	8/06/2015	<i>P. avium</i>	
BI2-23H	E25	Feuilles	8/06/2015	<i>P. avium</i>	Chancre sur tronc et taches sur feuilles
BJ2-6T	E26	Feuilles	8/06/2015	<i>P. avium</i>	
BF2-7V	E30	Feuilles	28/07/2015	<i>P. avium</i>	Plages nécrotiques parfois déformantes, taches brunes
BF2-12W	E31	Feuilles	28/07/2015	<i>P. avium</i>	Chloroses, Nécroses qui finissent par tomber
BF2-8E	E32	Feuilles	28/07/2015	<i>P. avium</i>	Petites taches brunes, chlorose légère et nécroses
BF-Bas	E33	Feuilles	28/07/2015	<i>P. domestica</i>	Chlorose, taches brunes, jaunissement, dessèchement
BA-3O	E34	Feuilles	28/07/2015	<i>P. domestica</i>	Chlorose le long des nervures, nécroses périphériques

Résumé

Le dépérissement constaté sur *Prunus* à l'unité expérimentale arboricole de Bourran, a remarquablement augmenté lors de ces dernières années. Les symptômes observés sont nombreux et les causes sont méconnues. L'objectif de cette étude est de réaliser un rapprochement entre l'état phytosanitaire des vergers et les éventuelles causes de dépérissement. Les travaux ont porté sur quatre parcelles de ressources génétiques : une de prunier (*Prunus domestica*) et trois de cerisier (*Prunus avium*). Deux hypothèses ont été émises i) les dépérissements sont d'origine abiotique, ii) les dépérissements sont d'origine parasitaire. Une démarche de diagnostic a été adoptée afin de vérifier ces hypothèses, en partant d'un relevé visuel sur le terrain complété d'une analyse de détection au laboratoire. Des zones de dépérissement ont été distinguées en juxtaposant la localisation des symptômes sur le plan de chaque parcelle. La plupart de ces zones correspondent aux parties les plus humides des parcelles, et aux bordures les plus exposées au soleil. Ces éléments suggèrent que la majorité des symptômes de dépérissement sont d'origine abiotique. Les genres bactériens *Pseudomonas* et *Xanthomonas* n'ont pas été détectés dans les échantillons analysés. Les analyses fongiques ont montré une présence majoritaire de champignons saprophytes qui peuvent devenir parasites secondaires. Le champignon *Phoma macrostoma* reconnu comme pathogène de pommier a été isolé sur deux échantillons de cerisiers ; néanmoins il n'a pas été décrit sur cerisier ni sur les autres espèces de *Prunus*. Ce résultat nous encourage à réaliser d'autres analyses plus poussées afin de déterminer l'incidence et l'effet de *Phoma macrostoma* sur les espèces de *Prunus* surtout le cerisier.

Mots clés: *Prunus*, cerisier, prunier, dépérissement, diagnostique, causes biotiques, causes abiotiques, détection bactérienne, détection fongique, *Phoma macrostoma*.

Abstract

The decline of *Prunus* in arboreal experimental unit at Bourran has remarkably increased in the last years. The causes of numerous expressed symptoms are unknown. The aim of this study is to make a rapprochement between the phytosanitary status of the orchards and the possible causes of dieback. We have followed the status of four genetic resources plots: one plot of plum (*Prunus domestica*) and three of sweet cherry (*Prunus avium*). Two hypotheses have been made i) the origin of the diebacks is abiotic, ii) the origin of the diebacks is parasitic. A diagnostic procedure has been adopted in order to verify these assumptions, starting by a visual observation followed by a detection analysis in the laboratory. The zones of diebacks are localized by juxtaposing the location of symptoms in plan of each parcel. Most of the diebacks areas correspond to the wetter parts of the plots, and to the most sun-exposed plots. These factors suggest that the majority of the decline symptoms are abiotic. The bacterial genera *Pseudomonas* and *Xanthomonas* were not detected in the samples analyzed. Fungal analyzes showed a majority presence of saprophytic fungi that can become secondary pests. The fungus *Phoma macrostoma* recognized as apple pathogen was isolated from two samples of cherry; however it has not been reported on cherry or on other species of *Prunus*. This result encourages us to perform other advanced analyzes to determine the impact and effect of *Phoma macrostoma* on *Prunus* species especially cherry.

Key words: *Prunus*, cherry, plum, dieback, diagnostic, biotic causes, abiotic causes, bacterial detection, fungal detection, *Phoma macrostoma*.