

UNIVERSITE SAAD DAHLEB – BLIDA

Faculté des sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques

Département d'Agronomie

MEMOIRE DE MAGISTER

Option : Amélioration des productions végétales

INCIDENCE DE L'ESCA ET DE L'EUTYPIOSE DANS QUELQUES VIGNOBLES ALGERIENS ET IDENTIFICATION DES CHAMPIGNONS PATHOGENES ASSOCIES

Par

Akila BERRAF- TEBBAL

Devant le jury composé de :

S.A. SNOUSSI	Maître de conférences. Univ. Blida	Président
J.P. PEROS	Chargé de recherches. INRA. Montpellier	Promoteur
M. BENCHAABANE	Chargé de cours. Univ. Blida	Co-Promoteur
N. SABAOU	Professeur. ENS. Kouba	Examineur
L. KHELIFI	Maître de conférences. INA. Alger	Examineur
A. BENZAADA	Chargé de cours. Univ. Blida	Examineur

Blida, Septembre 2004

RESUME

Les dépérissements de la vigne constituent une affection très redoutable qui préoccupe depuis toujours les vignerons. L'esca et l'eutypiose sont deux maladies fongiques en recrudescence, provoquant des dépérissements de la vigne. En dépit de leur ancienne connaissance, ces maladies sont peu étudiées. Elles sont devenues une vraie menace pour les vignobles, surtout en Europe, où l'arsénite de sodium a été interdit. Dans les vignobles Algériens, les dépérissements sont peu ou pas du tout étudiés. Les enquêtes réalisées au niveau des régions viticoles d'Alger, Tipaza, Médéa et Mascara ont montré que l'esca et l'eutypiose sont présentes dans les différentes parcelles et leurs incidences varient de 1,4% à 49,4% pour l'eutypiose et 5,8% à 28,1% pour l'esca. Quant à la mortalité des ceps, les taux varient de 3,2% à 75,2%.

L'analyse microbiologique des ceps dépérissants, prélevés des huit vignobles montrent que, en dépit de la diversité et de l'abondance de la microflore rencontrée, six champignons sont inféodés aux dépérissements : *Eutypa lata* (agent de l'eutypiose), *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Fomitiporia punctata*, *Phomopsis viticola* et *Botryosphaeria sp.* La caractérisation macromorphologique et micromorphologique, met en évidence l'identité de ces agents fongiques signalés dans plusieurs études relatives aux dépérissements de la vigne en Europe et ailleurs. L'identification moléculaire (PCR) a permis de confirmer l'identité de deux champignons pionniers, à savoir : *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*.

Mots clés : Vigne, dépérissements, esca, eutypiose, nécroses, champignons.

SUMMARY

Grapevine declines have become a limiting factor for many grapevine production areas around the world. Esca and Eutypa dieback are two cryptogamic diseases. They are two of the most destructive diseases of the woody tissues in grapevine. The etiology of esca and Eutypa dieback is still partly unknown. The ban of sodium arsenite in European vineyards contributed greatly to the increase of these diseases.

In Algeria, apparently, there is little research in trunk diseases of grapevine. Surveys in four wine-growing regions revealed that their incidence is variable between 1.4% to 49.4% for Eutypa dieback, and between 5.8% to 28.1% for esca disease.

Microflora examination of pruning wounds, indicated that several micro-organisms have been isolated in vines suffering from dieback. Among these fungi, *Eutypa lata* (causal fungus of dieback), *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Fomitiporia punctata*, *Phomopsis viticola* et *Botryosphaeria* sp. have been isolated with high frequency from the wood of diseased vines. Moreover, these fungi have been reported from various countries including European vineyards. Based on molecular study (specific PCR), we have confirmed the identity of the first wood colonizers: *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*.

ملخص

تعد ظاهرة تلف الكروم ظاهرة من أهم الظواهر التي تشد انتباه و قلق منتجي الكروم. « esca » و « eutypiose » مرضان فطريان خطيران في انتشار، بل نستطيع أن نجزم دون مبالغة من أنهما أصبحا يهددان الكروم، خاصة الأوروبية منها بعد حظر الأرسنيت الذي يعد العلاج الكيميائي الوحيد لهذا المرض . على الرغم من اكتشاف هذين المرضين في وقت مبكر، إلا أن الأبحاث فيهما قليلة إن على المستوى العالمي أو المحلي ، على أن انصاف القول ، تبقى الأبحاث العلمية في الجزائر حول هذا الموضوع قليلة جدا إن لم نقل معدومة .

إن التحريات التي قمنا بها و التي خصت مناطق معينة من الجزائر و هي : الجزائر الوسطى المدية، تيبازة ، و معسكر ، مكنتنا من التأكد من وجود هذين المرضين و انتشارهما بنسبة تتراوح من 1,4 % إلى 49,4% بالنسبة إلى « eutypiose » وبنسبة تتراوح من 5,8% إلى 28,1% بالنسبة ل« esca » .

الفحص الميكروبيولوجي لأشجار الكروم في طور التلف ، و المنتقاة من مناطق مختلفة أظهرت إضافة إلى كثرة و تنوع الميكروفلورة ، وجود ست فطريات تؤدي إلى تلف الكروم و هي :

Eutypa lata, Phaeomoniella chlamydospora, Phaeoacremonium aleophilum,
Fomitiporiapunctata, Phomopsis viticola et Botryosphaeria sp.

الدراسة الماكرومورفولوجية و الميكرومورفولوجية أثبتنا هوية هذه الفطريات المسببة لتلف الكروم ، و المشار إليها في عدة دراسات و أبحاث سواء كانت في أوروبا أو في غيرها من البلدان . إن استعمال تقنية PCR مكنتنا من التعرف و التيقن من الفطريات التي تحتل أولا جدع النبتة و هي :

Phaeomoniella chlamydospora, Phaeoacremonium aleophilum.

REMERCIEMENTS

Au terme de ce présent mémoire, qu'il me soit permis de remercier Monsieur J.P. PEROS et Monsieur M. BENCHAAABANE qui ont bien voulu se charger de la direction de ce travail. Leur aide m'a été précieuse.

Je tiens particulièrement à exprimer ma profonde gratitude au Dr J.P. PEROS, chargé de recherches à l'INRA de Montpellier, de m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour le temps qu'il m'a généreusement accordé, pour son soutien scientifique, ses nombreux conseils et encouragements tout au long de cette étude.

Je voudrais également, remercier G. BERGER de l'UMR DGPC pour son aide efficace et sa générosité.

Je remercie vivement Monsieur S.H. SNOUSSI, maître de conférence et vice-recteur chargé de la pédagogie à l'université de Blida, d'avoir accepté la charge de présider le jury de cette thèse.

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

Monsieur N. SABAOU, professeurs à l'ENS de Kouba.

Monsieur L. KHELIFI, maître de conférence à l'INA d'Alger.

Monsieur A. BENSAADA, chargé de cours au département d'Agronomie, qui a suivi avec intérêt la progression de ce travail et m'a toujours prodigué ses encouragements.

Je tiens également à remercier :

Mesdames F.Z. BENREBIHA, CH. CHAOUIA, F. BOUCHENAK pour leur collaboration dévouée. Elles n'ont jamais cessé de m'encourager et de me fournir les conditions intellectuelles et matérielles indispensables à mon travail. Je suis heureuse aujourd'hui de leur exprimer toute ma reconnaissance.

Monsieur H. HAMADOU de la ferme Hamamou de Benchicao, Madame et Monsieur GUEDIDER de l'I.N.P.V. de Mascara, Monsieur FODHIL-CHERIF de la D.S.A de Tipaza et FADHILA de la ferme Kerfa de Hamr-El-Ain, auxquels j'associe les viticulteurs des différentes régions pour leur collaboration dans le travail de terrain.

Dr BELOUI de l'hôpital Parnet (laboratoire de cytologie) ainsi que toute l'équipe de l'institut Pasteur de Sidi Fredj, pour l'accueil qu'ils m'ont réservé et l'aide qu'ils m'ont apporté.

Tous les techniciens du département d'agronomie, plus particulièrement DJAMILA FADIL pour son aide et sa disponibilité.

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
REMERCIEMENTS	4
TABLES DES MATIERES	5
Liste des illustrations, graphiques et tableaux	7
INTRODUCTION	10
1. DONNEES GENERALES SUR LES DEPERISSEMENTS DE LA VIGNE	13
2. L'EUTYPIOSE	14
2.1. Présentation de l'eutypiose - <i>Eutypa lata</i> - (Pers. : Fr) Tul. et C : Tul.	14
2.2. Symptomatologie	15
2.3. Biologie d' <i>Eutypa lata</i>	18
2.4. Epidémiologie	19
2.5. Facteurs influençant le développement de la maladie	22
2.6. Méthodes de lutte disponibles	24
3. L'ESCA	27
3.1. Présentation de l'esca	27
3.2. Symptomatologie	29
3.3. Particularités des agents pathogènes : le syndrome de l'esca	34
3.4. Biologie et systématique des champignons associés à l'esca	36
3.5. Facteurs influençant le développement de la maladie	40
3.6. Méthodes de lutte	42
4. SYNOPTYQUE DES SITS DE SUIVI	44
4.1. Localisation géographique et caractéristiques climatiques	44
4.2. Caractéristiques des parcelles étudiées	45
5. EVALUATION DES DEPERISSEMENTS DANS LES VIGNOBLES	47
5.1. Méthodologie des enquêtes	47
6. RECHERCHE ET ISOLEMENT DES CHAMPIGNONS IMPLIQUES DANS LE DEPERISSEMENT	51
6.1. Prélèvement des ceps à analyser	51
6.2. Isolement des champignons	51
7. IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE ET MOLECULAIRE DES ISOLATS	53
7.1. Identification des isolats	53

8. RESULTATS DES ENQUETES SUR LE TERRAIN	63
8.1.Symptomatologie	63
8.2. Etat des dépérissements au niveau des vignobles	69
9. CARACTERISATION ET IDENTIFICATION DES AGENTS FONGIQUES	78
9.1. Différents aspects du bois nécrosé	78
9.2. Aspect des nécroses en relation avec les symptômes des parties herbacées	82
9.3. Agents fongiques impliqués dans le dépérissement	83
10. LOCALISATION DES AGENTS FONGIQUES DANS LES NECROSES ET LEUR RELATION AVEC LE CEPAGE ET LA REGION	94
10.1. Localisation des champignons dans les différentes nécroses	94
10.2. Répartition des agents fongiques selon les cépages	96
10.3. Répartition des agents fongiques selon la localité et la région	98
CONCLUSION	100
A. LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS	103
B. ANNEXES	104
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	114

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1	: aspect rabougri des rameaux.....	17
Figure 2	: a) feuille saine b) feuille nécrosée.....	17
Figure 3	: a) grappe saine b) symptômes d'eutypiose sur grappe.....	17
Figure 4	: forme sexuée d' <i>E. lata</i> présente a la surface du bois mort.....	17
Figure 5	: nécrose brune et dure sectorielle.....	17
Figure 6	: a) conidies filiformes b) germination des conidies	20
Figure 7	: fructification d' <i>E. lata</i> a) asques b) ascospores.....	20
Figure 8	: cycle infectieux d' <i>Eutypa lata</i>	20
Figure 9	: forme lente de l'esca	31
Figure 9a	: symptômes d'esca sur feuille de cépage noir.....	31
Figure 9b	: symptômes d'esca sur feuille de cépage blanc.....	31
Figure 9c	: dessèchement de la grappe.....	31
Figure 9d	: symptôme d'esca sur grappe.....	31
Figure 10a	: nécrose claire et tendre en position central.....	33
Figure 10b	: nécrose claire et tendre en position sectorielle.....	33
Figure 10c	: nécrose brune et dure en position centrale.....	33
Figure 10d	: nécrose brune et dure en position sectorielle.....	33
Figure 11	: forme foudroyante de l'esca.....	33
Figure 12	: processus de dégradation du bois par les champignons de l'esca	35
Figure 12a	: premier processus de dégradation du bois par Pch, Pal et Fop.....	35
Figure 12b	:deuxième processus de dégradation du bois par <i>E. Lata</i> et Fop.....	35
Figure 14	:conidiophores (a) conidies (b) et chlamydospore(c) de <i>Phaeoconiella chlamydospora</i> . 37	
Figure 15	:conidiophores (a) et conidies (b) de <i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	37
Figure 16	:carpophore de <i>Fomitiporia punctata</i>	39
Figure 17	:carpophores de <i>Stereum hirsutum</i>	39
Figure 18	: cep fondu au point de jonction des bras. Pierre glissé permettant l'aération du cep.....	39
Figure 19	: symptôme d'eutypiose sur les parties herbacées.	62
Figure 20	: aspect rabougri des rameaux feuilles petites et chlorosées.....	62
Figure 21	: Symptôme d'eutypiose sur un seul bras (a).....	62
Figure 22	: Cep avec un bras mort (a) Développement normale du reste de la souche (b).....	63
Figure 23	: Nombre important de ceps dépéris	63
Figure 24	: forme apoplectique de l'esca dessèchement brutal du cep.....	65
Figure 25	: forme lente de l'esca.....	65
Figure 26	: symptômes sur feuille de cépage noir	65

Figure 27	: symptômes sur feuilles cépage blanc	65
Figure 28	: symptômes d'esca sur fruits a)dessèchement de la grappe b)présence de taches brunes	66
Figure 29	: dessèchement brutal d'un cep chargé de fruits.....	66
Figure 47	: pourcentage de ceps morts, présentant des symptômes d'eutypiose et des bras morts...	67
Figure 48	: pourcentage des ceps présentant des symptômes d'esca au niveau des parcelles	69
Figure 49	: taux de mortalité, de présence de bras mort, d'eutypiose et d'esca par cépage.....	70
Figure 50	: pourcentage des ceps morts, atteints d'eutypiose, d'esca et de bras morts par région....	72
Figure 51	: incidence de l'eutypiose, de l'esca et indice de dépérissement de l'eutypiose	75
Figure 30	: nécrose brune et dure en position centrale	76
Figure 31	: nécrose brune et molle en position centrale	76
Figure 32	: nécrose centrale de couleur claire (A) bordée par un liseré (B)	76
Figure 33	: nécrose claire et tendre (A) délimité par un liseré (B) en position sectorielle	76
Figure 34	: nécrose brune et dure en position sectorielle caractéristique de l'eutypiose.....	76
Figure 35	: association des nécroses brunes et dures en position centrale et sectorielle.....	76
Figure 36	: association des nécroses claires et tendres en position centrale et sectorielle	79
Figure 37	: ponctuations noires (PN) au niveau du bois sain.....	79
Figure 38	: coupe longitudinale dans un tronc	79
Figure 39	: coupes transversales dans un tronc montrant la succession des nécroses	79
Figure 40	: culture d' <i>Eutypa lata</i> âgée d'un mois présence de pycnides.....	83
Figure 40a	: Pycnide (A) libérant des stylospores (B)	83
Figure 40b	: stylospores(B) filiformes arquées	83
Figure 41	: Périthèces d' <i>Eutypa lata</i> à la surface Du bois mort	83
Figure 41a	: libération des asques et des ascospores	83
Figure 42	: culture de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> âgée d'un mois sur milieu PDA.....	85
Figure 42a	: mycélium cloisonné et ramifié.....	85
Figure 42b	: conidiophore renflé et pigmenté	85
Figure 43	: culture de <i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	87
Figure 43 a	: mycélium cloisonné et ramifié. (A) conidiophore.....	87
Figure 44	: culture de <i>Fomitiporia punctata</i> âgée d'un mois	87
Figure 44a	: mycélium jaune or dépourvu de cloisons	87
Figure 45	: culture de <i>Botryosphaeria sp.</i> Sur milieu PDA, âgée d'un mois	87
Figure 45a	: mycélium cloisonné et ramifié de couleur brun foncé	87
Figure 46	: culture de <i>Phomopsis viticola</i> sur milieu PDA, âgée d'un mois.....	88
Figure 46a	: pycnide (A) libérant les conidies (B)	88
Figure 52	: Résultat de l'amplification de l'ADN de <i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	89
Figure 53	: Résultat de l'amplification de l'ADN de <i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	90
Figure 54	: Résultat de l'amplification de l'ADN d' <i>Eutypa lata</i>	91

Tableau 1 : Les différents facteurs susceptibles d’agir sur le dépérissement de la vigne.....	22
Tableau 2 : Sensibilité des cépages à l’eutypiose au vignoble	23
Tableau 3 : Différentes caractéristiques des parcelles.....	46
Tableau 4 : Dates des observations effectuées dans les parcelles.....	48
Tableau 5 : Echelle d’évaluation des symptômes d’eutypiose	48
Tableau 6 : Echelle de notation des symptômes d’esca.....	49
Tableau 7 : Principales caractéristiques des isolats de référence	53
Tableau 8 : Principales caractéristiques des isolats et des ADN d’ <i>Eutypa lata</i>	54
Tableau 9 : Principales caractéristiques des isolats et des ADN de <i>Ph. chlamydospora</i>	55
Tableau 10 : Principales caractéristiques des isolats et des ADN de <i>Phaeoacremonium</i> <i>Aleophilum</i>	55
Tableau 11 : Caractéristiques des amorces	58
Tableau 12 : Nombre de ceps, selon la parcelle de prélèvement, présentant les symptômes de dépérissement.....	76
Tableau 13 : pourcentage de ceps examinés selon les symptômes en relation avec les nécroses (%).....	80
Tableau 14 : Fréquence d’isolement des agents fongiques.....	82
Tableau 15 : Fréquence des champignons en relation avec la forme et la couleur des nécroses.....	92
Tableau 16 : Fréquence des champignons en relation avec les cépages.....	94
Tableau 17 : Fréquence des champignons en relation avec la localité et la région.....	96

INTRODUCTION

La viticulture occupe une place de choix au sein de l'agriculture algérienne. Il existe plusieurs régions à vocation viticole telles que Médéa, Mascara, Ain-Témouchent qui ont développé cette spéculation depuis plus d'un siècle. Selon les statistiques recueillies auprès des services de la production végétale du ministère de l'agriculture, les superficies viticoles ont atteint en 2002, les 81.550 ha repartis principalement en vignes de table (41.860 ha) et en vignes à vins (38.010 ha). Ces superficies sont de plus en plus importantes, depuis la mise en œuvre de nouveaux programmes de développement du secteur agricole, soutenus par le F.N.R.D.A (Fond National de Régulation et du Développement Agricole).

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

Sans doute, les dépérissements de la vigne constituent une affection très redoutable qui préoccupe depuis toujours les vignerons. L'esca et l'eutypiose sont deux maladies fongiques en recrudescence provoquant des dépérissements de la vigne. Il s'agit des plus graves affections de cette plante, car elles s'attaquent à la charpente de la souche dont elles provoquent la mort à plus ou moins court terme.

Les champignons responsables de ces maladies sont lignivores. Ils pénètrent principalement par les plaies de taille, ainsi que par d'autres blessures accidentelles et se développent lentement dans le bois des souches. Compte tenu du développement lent et irrégulier de ses parasites, ces maladies passent inaperçues au début de l'attaque, mais leur évolution n'en est pas moins inexorable et leur impact économique très important [1]. Ce sont des maladies anciennes, l'esca était connue du temps des Romains. Elle sévit dans tous les pays où la culture de la vigne est présente. Elle existe dans la plupart des pays du pourtour méditerranéen : Espagne, France, Italie, Grèce, Portugal, Turquie, ainsi qu'en Tunisie [2]. En

Algérie, la présence de l'esca a été signalée en 1892, par Debray in [3]. Quant à l'eutypiose, elle existe très probablement depuis longtemps, mais elle pouvait être confondue avec d'autres affections de la vigne.

En dépit de sa connaissance fort ancienne, l'esca a été peu étudiée en raison de la découverte fortuite au début du XX^{ème} siècle de l'efficacité remarquable de l'arsénite de sodium comme moyen de lutte. Par conséquent, le rôle exact des agents responsables n'est pas bien connu, puisque plusieurs champignons sont impliqués. Classiquement, les phytopathologistes sont habitués à assigner à une maladie bien définie un et un seul micro-organisme. L'esca déroge à cette règle. En effet, six champignons lui sont associés, ce qui lui vaut le nom de syndrome de l'esca [4]. *Eutypa lata*, agent de l'eutypiose, est l'un des champignons incriminés dans la maladie de l'esca. Il sert de pionnier dans l'une des voies de dégradation du bois [5]. Toutefois, certains symptômes sont caractéristiques de la présence de chacun de ces champignons, soit au niveau du feuillage, soit par les dégâts à l'intérieur du tronc.

En effet, ce sont des maladies du cep qui se sont considérablement étendues au cours des dernières années. Elles menacent sérieusement les vignobles, depuis l'interdiction de l'arsénite de sodium, dans tous les pays de l'Union Européenne [1]. A l'heure actuelle, il n'existe pas de moyens de lutte contre l'esca et l'eutypiose, qui risquent de devenir le problème phytosanitaire le plus important des vignobles. Ceci est d'autant plus préoccupant qu'aucune méthode de lutte efficace n'a été mise en oeuvre. Dans ce contexte, seules les mesures d'ordre prophylactique sont envisagées pour lutter contre ces maladies. Cela permettra de réduire la quantité d'inoculum et les risques de contamination du vignoble.

En Algérie, apparemment, aucune étude n'a été réalisée, pour évaluer la gravité de ces maladies. Dans cette optique, nous nous proposons d'étudier et dresser un premier bilan des dégâts des dépérissements, notamment, ceux dus à l'esca et l'eutypiose au niveau de huit vignobles, situés dans quatre régions à vocation viticole :

Alger (Ain-Benien et Ouled-Fayet), Tipaza (Hamr-El-Ain), Médéa (Benchicao) et Mascara (Mamounia et Ain-Faress).

Ainsi, après une mise au point bibliographique, nécessaire pour la compréhension du travail réalisé, l'objectif poursuivi, consiste à :

La conduite d'une enquête permettant de :

- Préciser la symptomatologie inhérente au dépérissement.
- Rassembler les principales caractéristiques descriptives des parcelles pouvant favoriser le développement de ces maladies (l'âge du vignoble, le porte-greffe, le cépage, ainsi que le mode de conduite).
- Evaluer l'importance et les conséquences du dépérissement.
- Cerner l'incidence de l'eutypiose et de l'esca dans les différents vignobles.

Rechercher les champignons associés aux dépérissements et leur identification par une caractérisation morphologique.

Identifier les champignons pionniers de l'esca à l'aide d'une technique moléculaire de diagnostic : la PCR (Polymerase Chain Reaction).

Préciser la relation des champignons isolés avec la symptomatologie au niveau de la végétation herbacée et des nécroses dans le bois.

CHAPITRE 1

DONNEES GENERALES SUR LES DEPERISSEMENTS DE LA VIGNE

Le dépérissement de la vigne, au sens large, regroupe l'ensemble des affections conduisant à la mort des ceps. Ces affections sont d'origines diverses qui peuvent être d'ordre pédologique suite à des excès d'acidité ou de salinité ou une asphyxie au niveau racinaire. Le dépérissement est également provoqué par de nombreux agents pathogènes, particulièrement, des champignons, des virus, des bactéries ou même des mycoplasmes [2].

Les opérations de taille chez la vigne, sont d'une première importance pour sa formation et sa fructification. Ainsi, chaque année les plaies de taille constituent des ouvertures exposant les ceps à des attaques par un important cortège de micro-organismes. Dans ces attaques, il y'a des colonisateurs primaires ou pionniers, surtout d'origine fongique ou bactérienne. Parmi ces parasites primaires, *Eutypa lata*, agent de l'eutypiose est considéré comme un champignon redoutable sur les ceps de vigne. Les attaques primaires engendrent l'installation d'autres agents parasites et opportunistes secondaires entraînant la décomposition progressive des tissus ligneux. La conséquence de ces actions primaires et secondaires est le dépérissement du cep [6].

Les différents travaux traitant le problème de dépérissement de la vigne d'origine parasitaire, ont mis en évidence la responsabilité de nombreux agents cryptogamiques, tels que : *Armillaria mellea*, agent du pourridié ; *Nectaria destructans*, agent du pied noir, *Phomopsis viticola*, agent de l'excoriose. Initialement, les actions pathogéniques de ces champignons étaient considérées spécifiques et indépendantes. Actuellement, de nombreux chercheurs ont souligné l'existence dans certains cas de relations entre ces différents agents fongiques [7]. Dans ce contexte, les travaux de Graniti *et al.*, [8] ont démontré que la présence de certains champignons pathogènes tels que *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc., *Eutypa lata* (pers. :Fr) Tul. et C.Tul. et *Botryosphaeria obtusa* (Schwein.) sur des ceps dépéris atteints par l'esca, sont responsables d'affections primaires bien qu'elles restent sous une forme latente. L'identification des maladies de dépérissement reste délicate car leur manifestation est ambiguë et présentent un faciès symptomathologique complexe [1].

CHAPITRE 2

L'EUTYPIOSE

2.1. Présentation de l'eutypiose - *Eutypa lata* - (Pers. : Fr) Tul. et C : Tul.

L'eutypiose est actuellement considérée parmi les maladies les plus graves de la vigne. En effet, elle sévit dans pratiquement toutes les régions viticoles du monde [9]. Cette maladie, signalée la première fois en Australie et en Californie en 1974, est chronologiquement la plus récente identifiée sur la vigne [10].

Cette affection est probablement beaucoup plus ancienne et les symptômes devaient apparaître à un seuil tellement bas qu'elle n'attirait pas l'attention du viticulteur, et étaient attribués à d'autres maladies, telles que le court-noué, l'excoriose, l'acariose, ou encore l'esca [11].

Sur des plants d'abricotier, Samuel [12] a isolé un champignon du genre *Cytosporina* responsable d'une maladie appelée «**Gummosis** » ou «**Dieback** » ou encore «**Dying arm disease** ». Les travaux d'Adam [13] et Carter [14] portant sur la caractérisation taxonomique de ce champignon, ont montré l'existence de la forme imparfaite, nommée *Cytosporina* puis *Libertella blepharis* et de la forme parfaite appartenant au genre *Eutypa*. A partir de ces travaux sur l'abricotier (*Prunus armeniaca*) l'espèce est ainsi dénommée : *Eutypa armeniaca*.

Rappaz [15] attribue définitivement le nom d'*Eutypa lata* (Pers : Fr.) Tul & C.Tul. au champignon responsable de l'eutypiose en l'honneur de Tulasne qui a réalisé sa première description (*Sphaeria Lata* Pers.) en 1801.

Initialement, l'abricotier était considéré comme seule plante hôte de l'agent fongique en question. D'autres travaux ont mis en évidence la réception de plus de 80 plantes hôtes appartenant à 27 familles botaniques, de ce champignon, réparties dans le monde entier [16].

Les conséquences économiques de l'eutypiose sont de plus en plus préoccupantes. Selon Dubos [17] ; Le Gall et Le Gat [18]; Munkvold *et al.*, [19], la réduction du volume de la

récolte est difficilement appréciable en début d'attaque et varie en fonction du cépage et des conditions culturales. Appréciation d'autant difficile à réaliser que les vignobles bien entretenus sont toujours en situation de surproduction.

En revanche, lorsque le taux de mortalité augmente au sein d'un vignoble, l'impact économique devient important. Dans ce vignoble, en plus des dégâts enregistrés sur le patrimoine viticole, la qualité des vins obtenus est dépréciée. Cette maladie a aussi des effets indirects sur la qualité en modifiant l'encépagement des vignobles, puisque les variétés sensibles sont peu à peu remplacées par des variétés plus tolérantes [10].

L'eutypiose est donc une maladie redoutable, économiquement et financièrement, très coûteuse pour le viticulteur soucieux de maintenir le potentiel qualitatif de son patrimoine viticole [17].

2.2. Symptomatologie

L'identification de l'eutypiose s'avère souvent délicate, elle est d'autant plus difficile que les symptômes sont d'apparition lente et complexe. Le plus souvent, des superpositions de symptômes d'origines différentes sont observées. L'apparition des symptômes de l'eutypiose nécessite cinq à dix ans après la contamination par *Eutypa lata* [17, 20].

En outre, les symptômes se manifestent de manière aléatoire selon les années, en fonction du cépage et des conditions climatiques (les printemps pluvieux aggravent l'expression des symptômes) [10]. L'intensité des symptômes dépend aussi de la variabilité du champignon. Des différences d'agressivité entre les souches ont été démontrées grâce aux observations réalisées sur des boutures de Cabernet- Sauvignon inoculées [21]. Cette variabilité a été étudiée directement au niveau de l'information génétique par la technique PCR-RAPD (Polymerase Chain Reaction- Random Amplified Polymorphic DNA), confirmant l'existence de la variabilité au niveau régional, à l'échelle de la parcelle et même au niveau du cep [22, 23, 5].

2.2.1 Au niveau des rameaux herbacés

Les premiers symptômes perceptibles s'observent au printemps sur les parties herbacées de la souche. Peu après le débourrement, un rabougrissement de la végétation souvent sur une seule partie du cep est observé (Figure 1), d'où la maladie du bras mort. D'après Fallot *et al.*, [10], la maladie affecte un ou deux bras mais elle peut par la suite s'étendre à l'ensemble de la souche conduisant à sa mort.

Les jeunes sarments issues d'un bras infecté ont une croissance ralentie et présentent des entre-nœuds très courts, mais toujours réguliers à la différence du Court-noué [24].

Les feuilles des parties malades présentent des tailles réduites, d'un vert pale, ou encore enroulées et déchiquetées (Figure 2). Elles sont souvent déformées, présentant des nécroses marginales pouvant se généraliser à l'ensemble du limbe. Dans les cas graves les feuilles disparaissent, ne laissant que les pétioles [2].

Les inflorescences et les grappes, si elles ne se dessèchent pas avant la floraison, présentent un port dressé et sont victimes d'une abondante coulure ou d'un millerandage en développant de petites baies souvent apyrènes (Figure 3) [25].

2.2.2. Au niveau du bois

En hiver, il est facile d'observer la présence du bras mort et des méplats sur le tronc qui correspondent à des zones nécrotiques dont l'origine est une grosse plaie de taille. Sur le bras mort où l'écorce s'est exfoliée, apparaissent des plages grisâtre à noirâtres, bosselées révélant la présence du champignon sous la forme d'un stroma, représentant la forme sexuée dénommée : les périthèces (Figure 4) [11].

Des coupes transversales effectuées sur des bras atteints ou des troncs morts montrent des zones nécrosées de consistance dure, de couleur brune, toujours sectorielles et bien délimitées (Figure 5) [26]. Les parties nécrosées montrent une apparence de bois mort qui se dégrade en une pourriture sèche de type cubique qui se casse très facilement [25]. Selon Galet [7], cette nécrose prend toujours naissance à partir d'une blessure qu'elle soit une plaie de taille ou une blessure due à un accident mécanique. Elle s'enfonce profondément dans les tissus du bois, et peut se propager au delà du bourrelet de greffe.



Figure 1 : Aspect rabougré des rameaux [11]

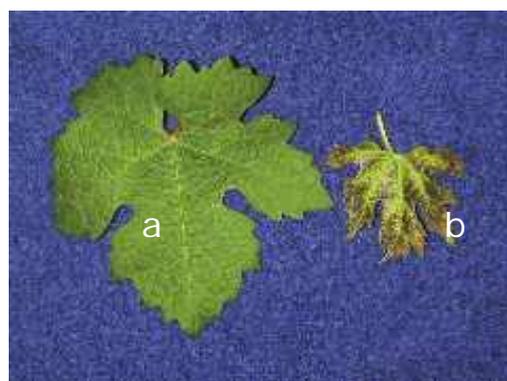


Figure 2 : a) Feuille saine b) Feuille nécrosée [2]

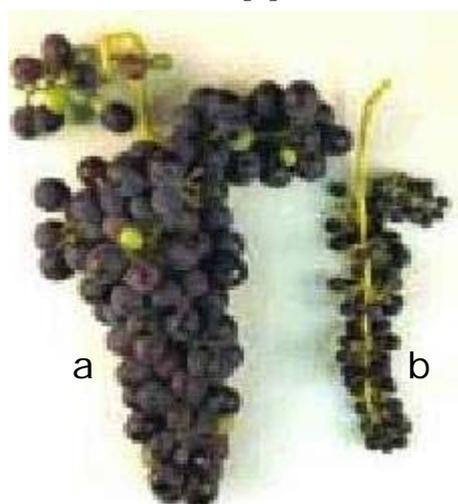


Figure 3 : a) Grappe saine b) Symptômes d'eutypiose sur grappe [1]



Figure 4 : Forme sexuée d'*E. lata* présente à la surface du bois mort [1]



Figure 5 : Nécrose brune et dure sectorielle [1]

2.3. Biologie d'*Eutypa lata*

Deux types de reproduction sont à différencier pour l'eutypiose :

La forme asexuée ou imparfait dénommée *Libertella blepharis* et la forme sexuée ou parfaite dénommée *Eutypa lata*. La classification se présente selon Dubos [1] comme suit :

Forme parfaite

Division : *Ascomycota*

Ordre : *Diatrypales*

Famille : *Diatrypacées*

Espèce : *Eutypa lata*

Forme imparfaite

Espèce : *Libetella blepharis*

Sur des milieux de culture gélosés et à des températures de 20 à 25°C, le champignon forme des colonies de couleur blanche et vigoureuses. L'abondance des filaments mycéliens donne un aspect échevelé à la culture. Le mycélium devient plus dense en vieillissant et se mélanise partiellement. Après 6 à 8 semaines de culture il peut produire des fructification asexuées [27, 2].

2.3.1. Forme imparfaite

La forme asexuée (*Libertella blepharis* A.L.Smith (syn. *cytosporina* sp.)) apparaît à la surface des bois infectés lorsque l'humidité est élevée. Elle précède ou accompagne le développement des fructifications sexuées [28].

Des pycnides noirâtres et globuleux, émettent des cirrhes jaunâtres contenant une multitude de conidies, qui sont filiformes, arquées hyalines et ont une longueur qui varie suivant les souches, de 16 à 45 µm (Figure 6) [29]. Belarbi [30], Ju *et al.*, [31] ont observé la germination des conidies sur milieu artificiel après exposition aux rayons ultra-violet (µv), toutefois, leur fonction dans le cycle infectieux reste inconnue.

2.3.2 Forme parfaite

La forme sexuée (*Eutypa lata* (Pers.) Tul & C.Tul) assure la dissémination de la maladie, elle se développe sous l'écorce 2 à 5 ans après la contamination sous forme d'un stroma noirâtre d'aspect bosselé. Ce dernier contient les fructifications ou périthèces qui ne peuvent se développer que dans les régions où la pluviométrie annuelle dépasse 350 mm [28].

Les périthèces sont des fructifications globuleuses de 300 à 500 μm de diamètre, prolongées par un col très court terminé par un ostiole s'ouvrant par un pore. Les loges des périthèces contiennent de nombreux asques et des filaments stériles appelés paraphyses [27].

Les asques cylindro-calviformes se composent d'une partie fertile (30 x 4-5 μm) et d'un pédicelle (70 - 120 μm), ils se terminent par un anneau apical [32]. Dans chacun des asques, huit ascospores allantoïdes, brun jaune, aux parois minces, mesurant 6,2 - 11 μm x 1,5 - 2 μm sont dénombrés (Figure 7). Ces périthèces, après une période de maturation deviennent fructifères. A maturité, le stroma peut entretenir des périthèces fertiles pendant 5 ans ou plus, en formant de nouvelles fructifications chaque hiver [26].

2.4. Epidémiologie

2.4.1 Cycle infectieux

Le cycle infectieux de l'eutypiose (Figure 8) est constitué, principalement, de deux phases importantes :

- l'émission et la dissémination
- la contamination

Les ascospores constituent l'inoculum infectieux et sont l'unique moyen de propagation de la maladie, elles sont libérées des périthèces sous l'action de la pluie et véhiculées par le vent [14]. Concernant les précipitations, Paillassa *et al.*, [33] signalent que le seuil minimum déclanchant la libération des spores est de 0,5 mm d'eau. Dubos [24] a montré que le début de la libération des spores a lieu dans les deux heures qui suivent le début de la pluie et qu'elle dure environ 36 heures, temps nécessaire pour vider les périthèces de leurs spores.

La dissémination par le vent de la sporée s'effectue sur de grandes distances pouvant atteindre 60 Km, les sites d'infection se situent dans la direction des vents dominants [34].

Les portes d'entrée des spores sont les blessures du bois, essentiellement les plaies de taille mais aussi les plaies dues au gel, à la grêle et à la vendange mécanique [9]. Au niveau des blessures, il existe des forces de succion qui entraînent les ascospores dans les vaisseaux du bois, selon le même auteur, ces ascospores s'engouffrent facilement dans les vaisseaux du bois grâce à leurs petites tailles et leur surface gluante qui leur confère une grande capacité d'adhésion. Elles germent dans une zone située à 4 ou 7 mm de profondeur [11].

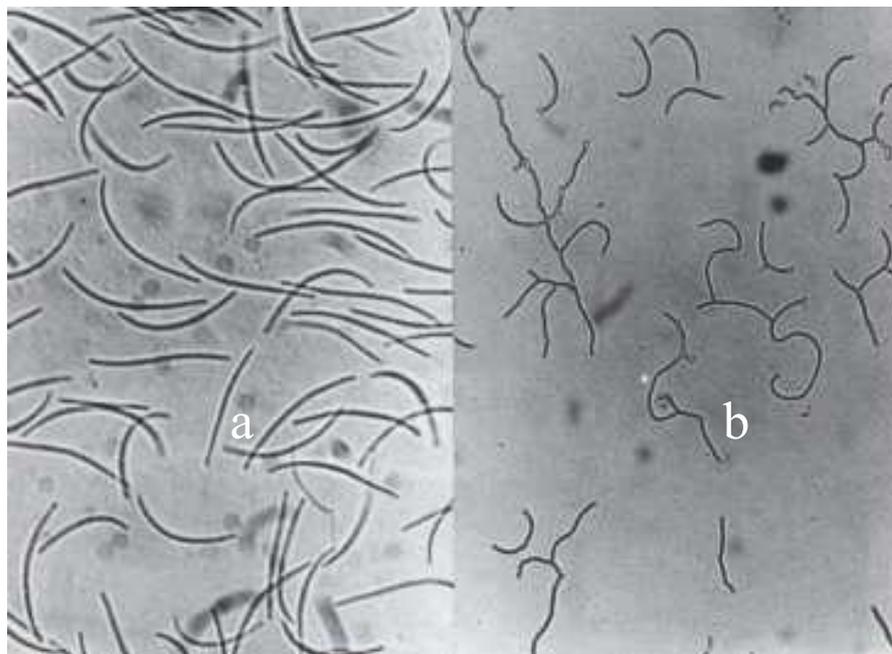


Figure 6 : a) Conidies filiformes d'*E. lata* (G : 80x10) b) Germination des conidies d'*E. lata* (G : 60x10)
[7]

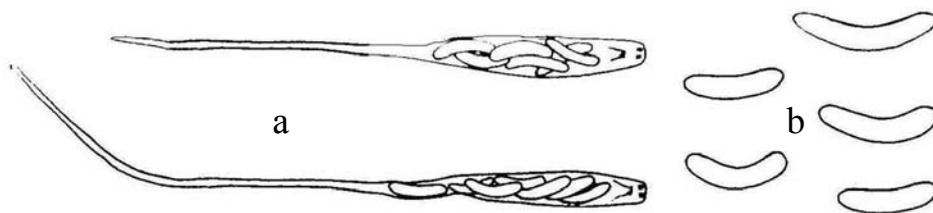


Figure 7 : Fructification d'*E. lata* [27]
a) asques (10µm) b) ascospores

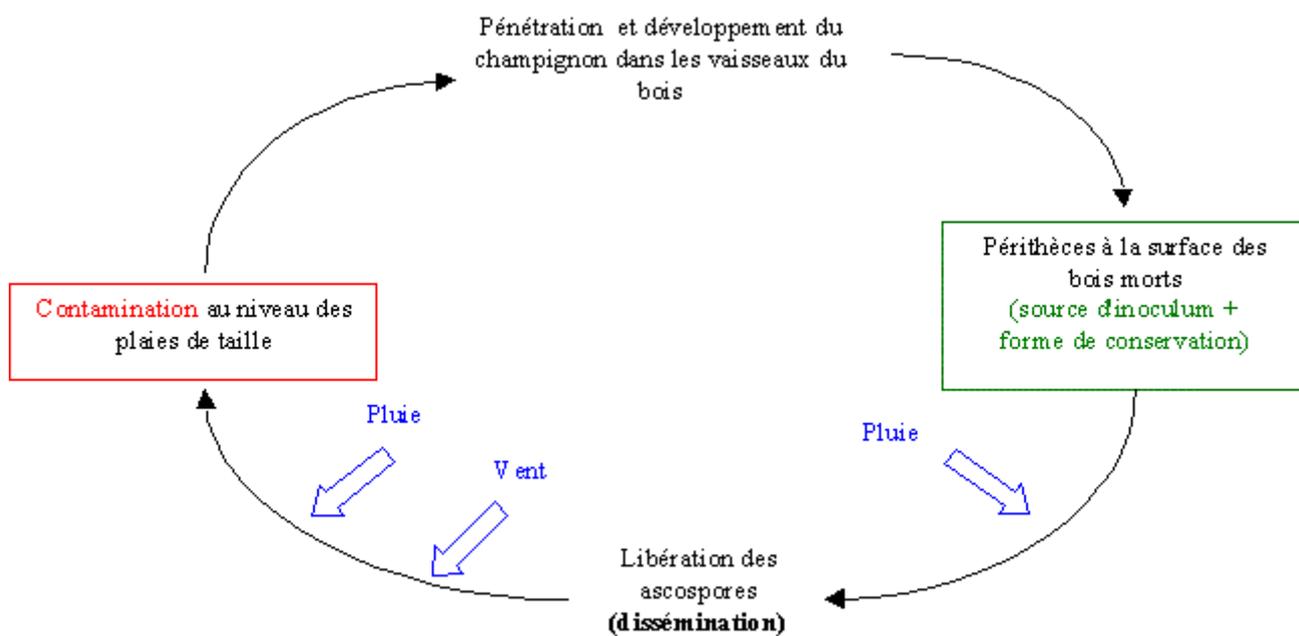


Figure 8 : Cycle infectieux d'*Eutypa lata* [1]

La sensibilité des blessures à l'infection diminue avec le temps, car la surface de ces lésions est colonisée par des micro-organismes saprophytes antagonistes qui rentrent en compétition avec *Eutypa lata* et gênent son développement [35]. En outre, plus la taille est tardive, moins les plaies sont sensibles aux contaminations par les ascospores, car la sève montante gêne leur pénétration [36, 17, 19].

2.4.2 Mode d'action du champignon

Les spores germent 24 heures après leur pénétration, à une température optimale de 22 à 25 °C, pour une durée de 11 à 12 heures, mais elle peut se faire entre 1 à 45°C [14]. Les spores donnent un mycélium végétatif qui se développe dans les vaisseaux et contamine les cellules annexes par les ponctuations. Son prolongement dans les tissus ligneux développe la nécrose sectorielle caractéristique [26].

Selon Grosclaude [6] l'agent pathogène dégrade les parois des cellules en altérant les polysaccharides (cellulose et hémicellulose) et dans une moindre mesure la lignine, induisant le développement de la nécrose brune et dure caractéristique de la maladie. Le mycélium colonise progressivement le reste de la souche, provoquant d'importantes nécroses. Il a été souligné que ce type de symptômes ne s'observe que sur le bois de plus de 3 ans. Moller et Kasimatis [37] remarquant l'absence du champignon dans les parties herbacées qui montrent des symptômes, ont émis l'hypothèse selon laquelle l'action à distance du champignon se ferait par un complexe toxique.

Des métabolites secondaires produits par *Eutypa lata* in vitro ont fait l'objet de plusieurs travaux de recherches pour leur implication dans l'expression des symptômes [38, 39, 40]. Ces travaux ont permis d'isoler et d'établir les structures chimiques de plusieurs composés. L'un d'eux présente une activité phytotoxique, il s'agit d'un composé de formule brute C₁₂H₁₀O₂ : Hydroxy-4 (methyl-3 butène-3 ynyl-1)-3 benzaldehyde (Annexe 1) appelé également **eutypine**. Ce composé s'avère absent dans les ceps sains et se retrouve dans la sève, les feuilles, les tiges et les inflorescences des plantes infectées [41, 10, 42]. Selon Tabacchi *et al.*, [43], la réduction de l'eutypine en un alcool (Eutypinol) pourrait être suffisante pour une détoxification et un blocage de l'action de l'eutypine.

2.5. Facteurs influençant le développement de la maladie

Le dépérissement des ligneux est dépendant de facteurs favorisant, déclenchants et contributifs (Manion et Lachance, 1992 in [44] (Tableau 1).

L'eutypiose est comme la plupart des maladies fongiques sont soumises pour leur développement aux facteurs de l'environnement. La multiplicité des facteurs intervenant dans le développement de l'eutypiose rend difficile l'analyse de leurs effets, d'autant plus que certains des facteurs sont indissociables. Selon Dubos [24] les conditions climatiques, les pratiques culturales, les cépages, les porte-greffes, la vigueur, et l'âge de la vigne sont des facteurs impliqués directement dans l'incidence de cette maladie.

Tableau 1 : Les différents facteurs susceptibles d'agir sur le dépérissement de la vigne [44]

Types de facteurs	Exemples de facteurs
Favorisants	Génotype, âge Sol (compaction, fertilité, drainage) Changement climatique Modification de la microflore
Déclenchants	Sécheresse, gelées Défoliation, excès de sel Modification du mode de conduite
Contributifs	Communauté fongique dont <i>Eutypa lata</i> Nématodes, insectes, virus

2.5.1 Cépages

La plus ou moins grande sensibilité des cépages à la maladie est en relation avec la fréquence et l'intensité d'expression des symptômes en végétation [35].

Des études faites par Péros et Berger [21] et Péros [44] sur la sensibilité des cépages à l'eutypiose révèlent une influence marquée du cépage sur l'incidence de la maladie. Toutefois, vu la complexité des facteurs agissant sur la réceptivité des cépages, il devient difficile d'établir un classement des cépages par rapport à leur réaction vis-à-vis du pathogène. Il est à signaler que la réponse d'un cépage peut dépendre d'un grand nombre de facteurs : caractéristiques des blessures et durée de leur réceptivité, agressivité des souches

d'*Eutypa lata* présentes, résistance à la colonisation (réaction de défense), tolérance aux toxines, aux stress et l'aptitude de compenser les effets du dépérissement.

Selon Péros [45] cette variabilité dans la réponse des cépages s'explique vraisemblablement par l'existence de seuils, différents selon les cépages, au-delà desquels le dépérissement prend irrémédiablement le dessus.

Néanmoins, un classement des cépages en fonction de leur sensibilité au champignon *Eutypa lata* a été établi par Dubos [24]. Ils ont été répartis en 4 catégories :

Tableau 2 : Sensibilité des cépages à l'eutypiose au vignoble [24]

Cépages très sensibles	Cépages sensibles	Cépages peu sensibles	Cépages résistants
Cabernet sauvignon	Alicante bouchet	Cabernet franc	Merlot
Sauvignon	Chenin	Malbec	Sémillon
Chasselas	Cinsaut	Riesling	Sylvaner
Negrette	Chardannay	Portugais bleu	Aligoté
Ugni blanc	Pinot noir	Gamay	Grolleau
Smauzac	Syrah	Duras	
Grenache.	Muscat ottonel	Colombard	
	Gewurztraminer		
	Pinot meunier		
	Tannat		
	Jurançon		
	Muscadelle		

2.5.2 Age de la vigne

L'attaque du champignon peut se faire dès la taille de formation du cep. L'effet de l'âge est déterminant sur le taux de symptômes observé [18]. Cette hypothèse a été testée sur un échantillon important de 250 parcelles, d'un même cépage. Il apparaît que l'âge est corrélé avec l'intensité de la manifestation des symptômes. Ceci est expliqué par le fait que les ceps âgés sont restés plus longtemps exposés aux risques des contaminations [46].

2.5.3 Mode de conduite

En viticulture le mode de taille adopté détermine l'importance des plaies sur les bras et le tronc. Toutes les pratiques qui augmentent le nombre et le diamètre des plaies de taille accroissent les risques de contamination par l'eutypiose [24, 44].

Une étude comparative réalisée par Boubals et Mus [47] portant sur deux modes de taille sur la variété Cabernet-Sauvignon âgé de 15 ans, montre que le cordon bilatéral dont les plaies sont petites, plus nombreuses mais réparties sur les bras est moins favorables que le Guyot simple qui consiste à rabattre le long bois au ras du tronc en faisant chaque fois une plaie de taille importante. L'adoption de modes de conduite plus adaptés à la mécanisation, passant du Gobelet traditionnel vers une forme haute palissée en Guyot laisse d'importantes plaies favorisant ainsi les contaminations [44].

2.5.4 Vigueur

Toutes les pratiques qui augmentent la vigueur de la plante, particulièrement dans les cinq premières années de plantation favorisent le développement de la maladie [1]. Les causes les plus souvent rapportées, sont la nature du sol (sols riches et reposés), les fumures excessives (apports azotés) et les portes greffes vigoureux. Des études de l'effet du porte-greffe sur l'expression des symptômes a été réalisé par Ferreira [48], Desaché *et al.*, [49] et Péros [45] ont montré que les portes greffes 41B et 99R sont plus favorable à l'expression des symptômes de la maladie comparativement aux souches greffées sur les porte-greffes 110R et 140R.

2.6. Méthodes de lutte disponibles

2.6.1 Lutte préventive

Les méthodes de lutte pratiquées vis-à-vis de l'eutypiose visent à :

Diminuer l'inoculum disponible par des techniques prophylactiques et optimiser la protection des plaies de taille par des produits chimiques [25, 7].

- La mise en œuvre de mesures prophylactiques strictes est déterminante, pour diminuer la pression de l'inoculum et augmenter l'efficacité de la lutte chimique.
 - Une mesure collective d'arrachage et d'incinération de tout pied et rameau morts d'eutypiose, apparaît comme la meilleure prévention à la propagation du champignon [26].

- Des époques de taille de la vigne de moindres risques pour l'installation de la maladie ont été proposées. La taille devrait être effectuée selon Chapuis [35] :

Le plus tardivement possible, afin de profiter de la montée de sève qui empêche la pénétration des spores. Par temps sec, sans vent pour diminuer les risques de propagation et en dehors des périodes sensibles, 3 à 4 jours après le début d'une pluie pour diminuer l'impact de la pluie sur la libération des spores.

- Eviter toutes les pratiques qui favorisent l'augmentation de la vigueur (porte-greffe vigoureux, fumure excessive, densité de plantation trop faible), mais sans laisser développer des ceps carencés.

➤ Actuellement, l'emploi de fongicides n'exerce que des effets préventifs. Il n'existe aucun produit curatif contre ce champignon. Un très grand nombre de fongicides ont été testés pour lutter contre l'eutypiose [28, 50, 37, 29]. Les meilleurs résultats sont obtenus par l'association de fongicides appartenant aux familles des Inhibiteurs de la biosynthèse des stéréols (IBS) et des benzimidazoles. L'**escudo**, composé de flusilazole et de carbendazime protège les plaies de taille, mais son application localisée, manuelle est contraignante pour les viticulteurs. Bien que le coût de l'application reste dérisoire par rapport à l'incidence économique de la maladie [1].

2.6.2 Mesures curatives

Toutes les mesures préventives peuvent s'avérer inefficaces. Il est en effet possible que le cep soit déjà contaminé lors de leur application. Or un cep atteint ne peut guérir de la maladie. Il est alors nécessaire d'envisager des mesures curatives [11].

Si la maladie touche une grande partie du vignoble, la solution la plus radicale consiste à tout arracher et à replanter des pieds sains en s'attachant particulièrement à la prophylaxie dès le plus jeune âge de la vigne. Cette opération doit s'intéresser au choix de cépages les moins sensibles à la maladie [1].

L'arrachage de ceps malades entraîne une augmentation des pertes de rendement. C'est pourquoi le recepage permet de régénérer les souches malades et de restaurer totalement la quantité et la qualité de la récolte, après deux années de cette intervention [11]. La technique

consiste à garder un gourmand pour établir un tronc sain et à supprimer le tronc malade tout en veillant à bien protéger la plaie. Au printemps, les ceps atteints sont repérés et marqués. En hiver, lors de la taille, les troncs seront coupés suffisamment bas là où la nécrose est absente. L'intérêt du recepage réside dans la conservation de l'ancien système racinaire et ainsi du potentiel qualitatif du cep [2].

Le sur greffage est appliqué lorsque la nécrose se manifeste trop bas dans le tronc, à condition que le porte greffe ne soit pas atteint. Le taux de réussite est de 75% pour les vignes âgées de moins de 25 ans, au-delà l'efficacité est incertaine. De même que pour le recepage, elle permet de restaurer en 2 ans un cep et elle permet aussi, le changement de cépages vers des variétés moins sensibles [25].

Des essais de lutte biologique avec des antagonistes d'*Eutypa lata* ont été mis en place. Ce fut le cas de *Trichoderma* sp., *Fusarium Laeritium* [51, 52] et *Gliocladium roseum* [54]. Ce type de lutte n'a pas été encouragé, vu les difficultés de formulation de spécialités commerciales pour des utilisations à grande échelle.

CHAPITRE 3

L'ESCA

3.1. Présentation de l'esca

L'esca est parmi les maladies cryptogamiques les plus anciennes décrites sur vigne. La description des symptômes similaires à ceux de l'esca est trouvée dans différents travaux grecs et latins. Une meilleure description se trouve dans les travaux médiévaux, tel que kitab al-felahah de Ibn- El-Awam, un musulman espagnol qui a vécu à la fin du douzième siècle, et de Pietro de Crescenzi, né autour de 1233 à Bologne [54].

Les travaux de recherche sur l'étiologie de l'esca ont commencé à la fin du 19ème siècle en France. Elles sont réparties en trois périodes [54] :

➤ La première a commencé avec Ravaz en 1898 et s'est terminée avec Viala en 1926.

Avant cette période, l'origine des flétrissements est restée longtemps ignorée. Mares [55] avait décrit l'esca comme «une maladie terrible et très anciennement connue qui frappe isolement les ceps au milieu de l'été, en pleine végétation, chargés de fruits et les fait périr en quelques jours ». Selon cet auteur, l'origine de cette mort, dite apoplectique est attribuée à un accident d'ordre physiologique désigné sous le nom de folletage. Ce n'est que vers la fin du 19ème siècle que l'apoplexie fut attribuée à un agent cryptogame [56]. Quelques années plus tard, il a été rapporté dans les environs de Montpellier (France) la présence de fructifications de *Polyporus igniarius* sur des souches malades [57]. Des coupes réalisées sur les ceps apoplectiques ont permis de constater la présence dans les tissus ligneux d'une enveloppe de bois plus ou moins saine, de couleur brune entourant un noyau tendre comme de l'amadou, et qui s'enlève facilement à la main.

Vinet [58] a observé également la présence du même champignon. Il a constaté l'abondance, avec des fréquences élevées, de fructifications de *Stereum hirsutum* (Wild.) pers. sur des ceps dépéris. En fin, Viala [59] a étudié d'une façon plus détaillée, les relations de ces deux champignons (*Stereum hirsutum* et *Polyprus igniarius*) avec l'apoplexie ainsi que la forme lente de l'esca, dont les symptômes n'ont pas été décrits auparavant. Suite à ces travaux, il propose le terme « **esca** » pour désigner cette maladie qui signifie dans le Patois provençal

ou languedocien Français « **amadou** ». Dans certains pays, elle reçoit un nom synonyme : « **iska** » en Grèce, « **escha** » en Italie, « **yassa** » en Espagne, « **Black-measles** » en Californie, et « **Mal delle Spacco** » en Italie, signifiant maladie de la fente parce que le tronc des vignes atteintes, présente souvent une fente ou un sillon longitudinal [60].

➤ La deuxième période de la recherche sur l'esca a débuté en Californie. Elle a été marquée par les travaux de Chiarappa [61] qui a fait une étude critique sur les différents travaux. Il considère, contrairement à Viala [59], *Stereum hirsutum* comme un agent saprophyte et met en évidence, le caractère parasitaire de *Phellinus igniarius*, auquel il associe un champignon imparfait *Cephalosporium sp.* en soulignant son importance dans la maladie. Ce champignon, a été ensuite apparenté au *Phialophora parasitica* Ajello, Georg et Wang [62].

A l'exception des travaux de Chiarappa [61], l'esca a été attribué dans les revues de pathologie végétale aux deux basidiomycètes: *Phellinus igniarius* et *Stereum hirsutum* [3, 62].

➤ La troisième période a été initiée en France les années 1980. La raison majeure de la reprise des études sur cette maladie est sa recrudescence dans tous les vignobles surtout en Allemagne, en Italie, en Grèce où l'arsénite de sodium, seul remède efficace qui été utilisé traditionnellement pour contrôler l'esca a été interdit en raison de sa toxicité, et remplacé par des fongicides moins efficaces [63, 24].

Larignon [4] a montré, par son étude sur l'identification et le mode d'action des microorganismes associés à la maladie, qu'au moins cinq champignons sont décrits. Aux microorganismes déjà cités ; *Stereum hisutum*, *Phellinus igniarius* et *Cephalosporium sp.* s'ajoutent *Acremonium sp.* et *Eutypa lata* qui se répartissent en deux séquences parasitaires ; hypothèse confirmée par la suite grâce aux tests de pathogénécité réalisés par Mugnai *et al.*, [54] et Larignon et Dubos [64]. Diverses études portant sur l'identification des différents microorganismes impliqués dans la maladie ont été entreprises dans différents pays, où l'esca est devenue un problème majeur pour les viticulteurs. Ainsi, la présence d'*Acremonium sp.*, *Phialophora parasitica* et *Phellinus sp.* a été confirmé dans divers vignobles [4, 54, 65, 66].

Crous *et al.*, [68] modifièrent la taxonomie des champignons impliqués dans le syndrome de l'esca en se basant sur des caractères morphologiques et culturales. Ils

proposèrent un nouveau genre intermédiaire entre *Acremonium* et *Phialophora* : *Phaeoacremonium* qui est composé de six espèces :

- Phaeoacremonium chlamydosporum* W. Gams *et al.* (ex. *Phialophora parasitica*) [61].
- Phaeoacremonium aleophilum* W. Gams *et al.* (ex. *Acremonium sp.*)
- Phaeoacremonium angustius* W. Gams *et al.*
- *Phaeoacremonium parasiticum* W. Gams *et al.*
- Phaeoacremonium rubrigenum* W. Gams *et al.*
- Phaeoacremonium inflatipes* W. Gams *et al.*

Au moyen de techniques de biologie moléculaire, Dupont *et al.*, [69], montrèrent que *Phaeoacremonium chlamydosporum* est différent des autres *Phaeoacremonium*, ainsi la position taxonomique de *P. chlamydospora* a été reconsidéré par Crous et Gams [70] et renommé *Phaeomoniella chlamydospora*.

Une nouvelle espèce, *Phaeoacremonium viticola*, a été proposée sur la base de critères morphologiques et moléculaires pour nommer les isolats produisant un pigment rouge [71].

Le *Phaeomoniella chlamydospora* et *Phaeoacremonium sp.* ont été associées dans plusieurs travaux à des dépérissements de jeunes plantations viticoles [72, 73, 74, 75, 54, 70]. Cette maladie appelée « **Black goo** », « **Slow dieback** », « **Slow decline** » et « **Phaeoacremonium grapevine decline** », a été récemment dénommée « **la maladie de Petri** » en l'honneur du chercheur Italien Pétri qui, en 1912 l'avait déjà décrite [76]. Dubos [1], mentionne que cette maladie peut être précurseur du syndrome de l'esca.

L'analyse des fructifications de *Phellinus* a montré qu'il s'agit de *Fomitiporia punctata* (Fr.ex Karst.) [64, 54]. Récemment, une nouvelle espèce, *Fomitiporia mediterranea*, a été identifiée en se basant sur des critères morphologiques et moléculaires (Polymeras Chain Reaction) [77].

3.2. Symptomatologie

Selon la nature et l'évolution des symptômes de dépérissement, l'esca présente deux formes différentes : la forme lente et la forme foudroyante (Figures 9 et 11).

3.2.1 Forme lente

L'altération du feuillage est le symptôme le plus fréquemment observé. Après la floraison, les symptômes apparaissent sur les feuilles situées à la base des rameaux et ensuite s'étendent à l'ensemble du rameau. Les feuilles prennent une coloration vert pâle qui évolue dans les zones internervaires pour provoquer le rougissement des cépages noirs (Figure 9a), et des jaunissements des cépages blancs (Figure 9b) ce qui donne un aspect marbré au feuillage [7].

Après ces premiers stades symptomatologiques, des nécroses marginales peuvent apparaître, et le cep meurt après quelques années suite à une perte progressive de sa vitalité [59, 60, 3, 24, 78, 79, 80].

Les symptômes sur les grappes sont variables selon la région et le cépage. Les grappes peuvent paraître normales, mais les baies restent petites et mûrissent mal finissant par s'éclater et se dessécher (Figure 9c) [59, 79].

Parfois, en l'absence de symptômes sur les feuilles, des taches bleuâtres à noirâtres apparaissent sur les baies (Figure 9d). Cette manifestation est très fréquente dans les vignobles de raisin de table en Californie [61, 81, 82] correspondant au faciès « **Black measles** ». En France, hormis le retard de maturation et quelques cas de flétrissement de la grappe, l'esca sous sa forme lente ne montre pas de symptômes caractéristiques au niveau des baies [7].

Il convient de noter l'extrême variabilité de l'expression de ces symptômes d'une année sur l'autre, en effet, un pied malade une année peut très bien, l'année suivante, paraître sain [11, 83, 84, 85].

Selon Sparapano *et al.*, [86], la plupart des symptômes visibles sur les ceps, peuvent être causés par des toxines, des enzymes ou autres métabolites produits par les champignons et se propagent dans le cep, par le biais de la sève.



Figure 9 : Forme lente de l'esca [54]



Figure 9a : Symptômes d'esca sur feuille de cépage noir [11]



Figure 9b : Symptômes d'esca sur feuille de cépage blanc [11]



Figure 9d : symptôme d'esca sur grappe

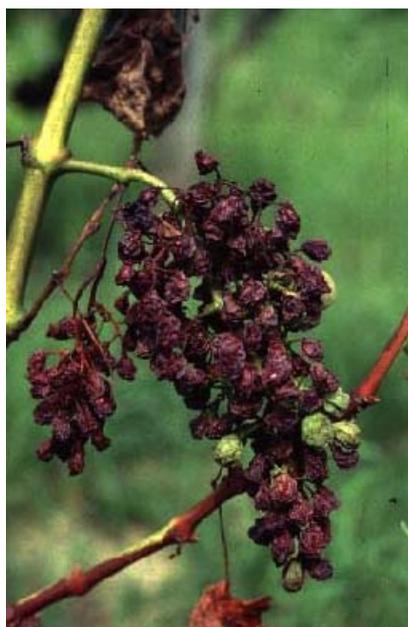


Figure 9c : Dessèchement de la grappe

[54]

Sous l'écorce du tronc et des rameaux âgés, on observe une bande continue de quelques centimètres de large de couleur brune, contrastant avec la couleur blanchâtre du bois sain. Cette bande s'arrête au niveau de la soudure chez les vignes greffées, alors qu'elle peut descendre jusqu'aux racines chez les vignes franches de pied [2, 1].

L'analyse des souches malades, en voie de dépérissement, permet d'observer, par des coupes transversales, deux types de nécroses caractéristiques de l'esca qui se distinguent non seulement par leur position, mais aussi par le nombre de zones qui les constituent (Figure 10) [4, 54, 78, 5, 87]:

➤ Une nécrose en position centrale qui comprend 3 zones (Figure 10a) :

Une zone claire au centre, constituée par une masse spongieuse, formée par du bois altéré, jaune, très friable, ressemblant à de l'amadou. Une deuxième sous forme d'un liseré de couleur noire et la troisième zone, périphérique, est d'une coloration brune rose et à consistance dure.

➤ Une nécrose en position sectorielle qui comprend deux zones (Figure 10b) :

Une zone claire et tendre cernée par une zone brun chamois à consistance dure.

Ces deux nécroses sont souvent associées et précédées, soit par :

- Une nécrose brune et dure, en position centrale (Figure 10c).
- Une nécrose brune chamois, dure en position sectorielle caractéristique de l'eutypiose. (Figure 10d).
- L'association de ces deux nécroses.
- Une nécrose brune et molle en position centrale.

Il est important de noter la présence de ponctuations noires, à la périphérie des nécroses.

3.2.2. Forme foudroyante ou Apoplexie

Cette forme brutale de dépérissement, se manifeste pendant les périodes de fortes chaleurs et souvent à la suite d'un orage. Contrairement à la forme lente, un dessèchement rapide des feuilles, rameaux et grappes survient en l'espace de quelques heures. Dans ces conditions, aucune pousse ne réapparaît l'année suivante. Selon Arnaud et Arnaud [60] tout se passe comme si le tronc et les bras de la souche avaient été sectionnés. Dans certains cas, les dégâts sont limités à une partie du cep. Au niveau du bois, les nécroses sont identiques à celles observées avec la forme lente [24, 7, 88] (Figure 11).

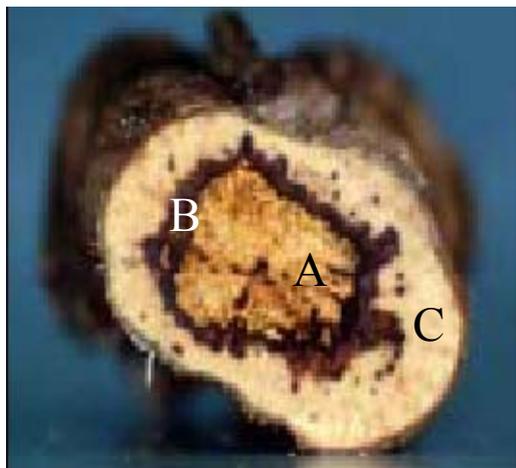


Figure 10a : Nécrose claire et tendre en position centrale
A : bois altéré, B : liseré noire, C: bois sain [54]

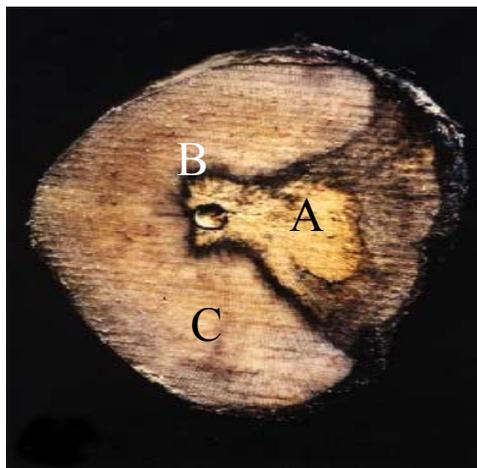


Figure 10b: Nécrose claire et tendre en position sectorielle [54]



Figure 10c : Nécrose brune et dure en position centrale [1]



Figure 10d : Nécrose brune et dure en position sectorielle [1]



Figure 11 : Forme foudroyante de l'esca [7]

3.3. Particularités des agents pathogènes : le syndrome de l'esca

3.3.1. Micro-organismes impliqués dans le syndrome de l'esca

Comme il a été cité auparavant, l'esca est traditionnellement attribuée aux deux champignons lignivores : *Stereum hirsutum* et *Phellinus igniarius*. Actuellement, divers travaux réalisés en France [87], Italie [78], Turquie [65], Australie [89], Californie [82], montrent l'implication d'une abondante microflore dans la maladie : *Botryosphaeria*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Gliocladium*, *Aspergillus*, *Pestalotia*, *Phomopsis*, *Mycelia sterilia* et même certains agents bactériens. Parmi ces champignons, certains ne sont peut être que des saprophytes ou des parasites secondaires, qui se développent dans le bois déjà attaqué par les espèces responsables de l'esca [90, 7, 1]. Cependant, les champignons les plus fréquemment isolés des ceps dépéris sont surtout : *Eutypa lata*, *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum*, *Fomitiporia punctata*, *Stereum hirsutum* [4, 91, 64, 54, 5].

3.3.2 Processus de dégradation du bois par les champignons impliqués dans le syndrome de l'esca

Larignon [4] considère qu'il existe deux processus responsables de la dégradation du bois caractéristique de l'esca (Figure 12):

a) Le premier processus aboutit à la formation de la nécrose claire à consistance tendre en position centrale. Trois champignons sont impliqués selon deux séquences (Figure 12a) :

- *Phaeoacremonium aleophilum* et *Phaeoconiella chlamydospora* qui sont isolés de la nécrose brune et dure en position centrale.
- *Fomitiporia punctata* provoque la nécrose claire et tendre en position centrale, caractéristique de l'esca.

b) Le second processus aboutit à la formation de la nécrose sectorielle de couleur claire et de consistance tendre, fait intervenir deux champignons (Figure 12b) :

- *Eutypa lata*, qui est isolé de la nécrose brune et dure, caractéristique de l'eutypiose.
- *Fomitiporia punctata*, qui, comme précédemment, provoque la dégradation du bois caractéristique de l'esca.

Les études engagées par de nombreux chercheurs, ont montré l'extrême complexité de cette maladie, et ont pu justifier l'hypothèse de l'implication des trois agents fongiques : *Fomitiporia punctata*, *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* qui agissent soit en association ou en succession [64, 87, 8, 92, 39, 84, 93].

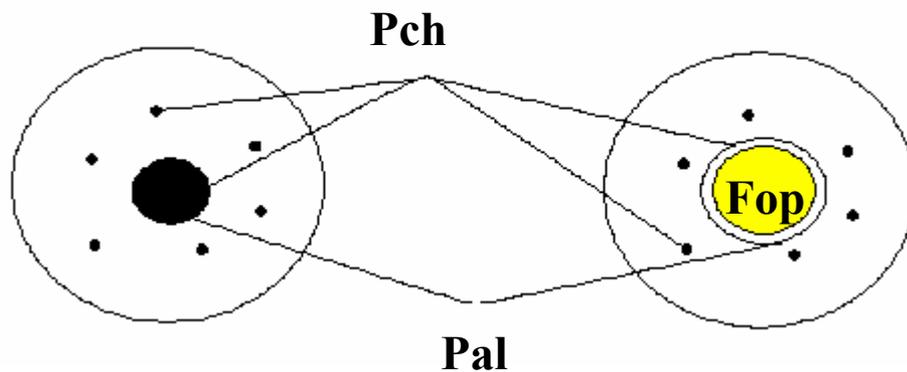


Figure 12a Premier processus de dégradation du bois par *P.chlamydospora* (Pch), *P.aleophilum* (Pal) et *F.punctata* (Fop) aboutissant à la nécrose claire et tendre en position centrale.

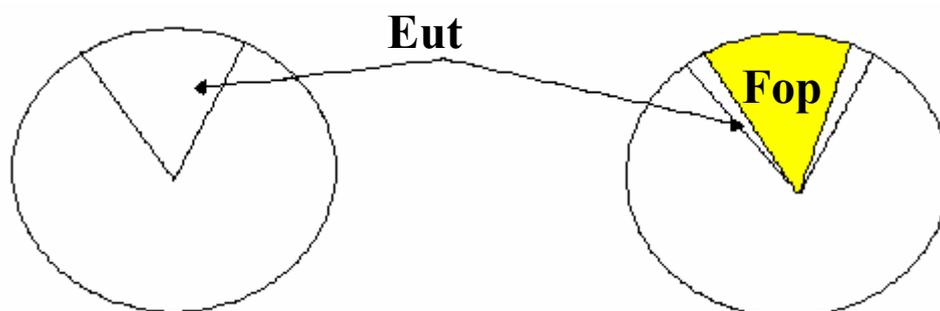


Figure 12b :Deuxième processus de dégradation du bois par *E.Lata* (Eut) et *F.punctata* (Fop) aboutissant à la nécrose claire et tendre en position sectorielle.

Figure 12 : Processus de dégradation du bois par les champignons de l'esca [1]

3.4. Biologie et systématique des champignons associés à l'esca

La maladie de l'esca peut être provoquée par de nombreux agents cryptogamiques. En plus d'*Eutypa lata*, décrit précédemment, nous notons :

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

Il se caractérise par des colonies de couleur vert clair à vert foncé sur milieu malt-agar. Les conidiophores sont renflés à leur base et pigmentés. Les conidies sont de forme oblongue à ellipsoïdale, elles sont droites, subhyalines (Figure 14). Leurs taille est de 2,4 à 6 x 1 à 2µm. La présence de chlamydospores est caractéristique de cette espèce, elles apparaissent généralement sur les cultures âgées d'au moins un mois. Les colonies se développent lentement avec un optimum thermique de 25°C [70].

La forme sexuée n'est pas encore identifiée, mais elle appartient probablement à la division des *Ascomycota* et à l'ordre des *Chaetothyriales* [1].

Phaeoacremonium

Ce genre crée par Crous *et al.*, [68] présente les caractéristiques suivantes : Les conidiophores simples ou ramifiés, le plus souvent pigmentés et plus particulièrement au niveau des cellules basales. Les phialides présentent des collerettes et les conidies sont hyalines, généralement de forme allantoïde.

La forme sexuée n'a pas encore été identifiée pour les espèces décrites sur la vigne, seule la forme imparfaite est connue et appartient probablement à la division des *Ascomycota* et à l'ordre des *Diaporthales* [1].

***Phaeoacremonium aleophilum* W.Gams, Crous, M.J.Wingf. et L.Mugnai, sp.nov.**

Les cultures sur milieu malt-agar sont de couleur grise beige à gris olive. La plupart des souches diffusent un pigment jaune dans le milieu. Les conidiophores sont simples ou ramifiés, le plus souvent pigmentés et plus particulièrement au niveau des cellules basales. Les phialides présentent des collerettes, les conidies sont hyalines de forme oblongue, ellipsoïdale voire allantoïde, droite ou légèrement courbée, (Figure 15) leur taille est de 4 à 5,5 x 1,6 à 2 µm. Il n'y a pas de chlamydospores. Sa température optimale de croissance est de 30°C [68].

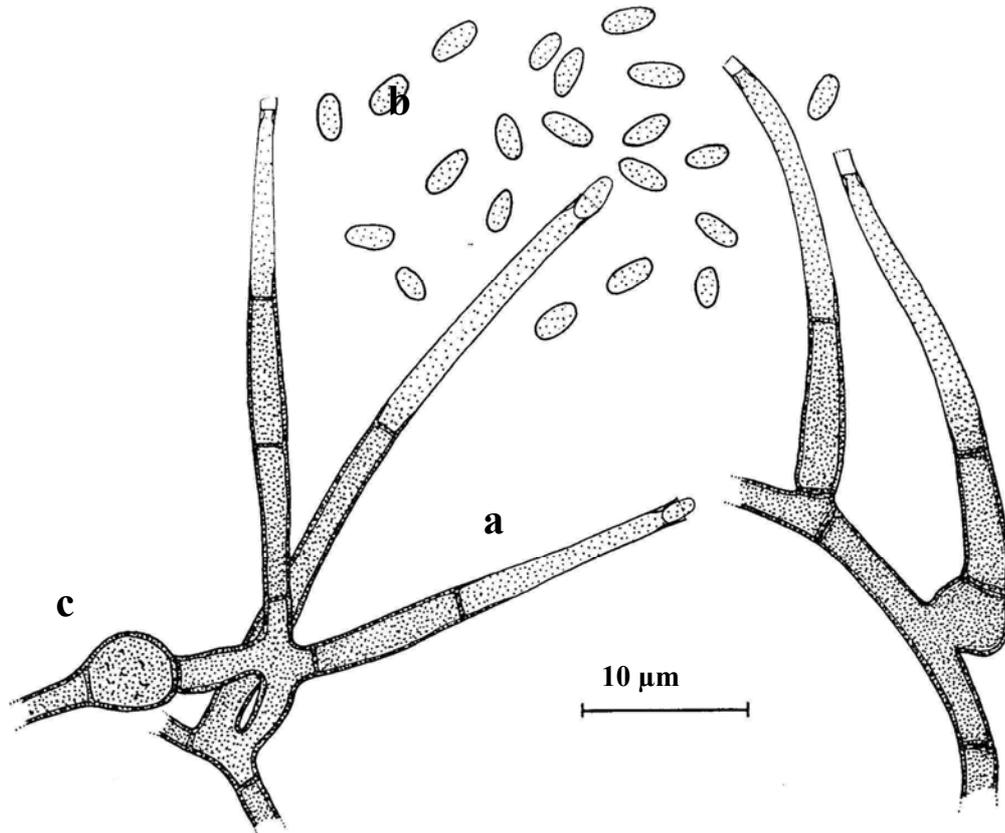


Figure 14 : Conidiophores (a) conidies (b) et chlamydospore(c) de *Phaeoconiella chlamydospora* [70]

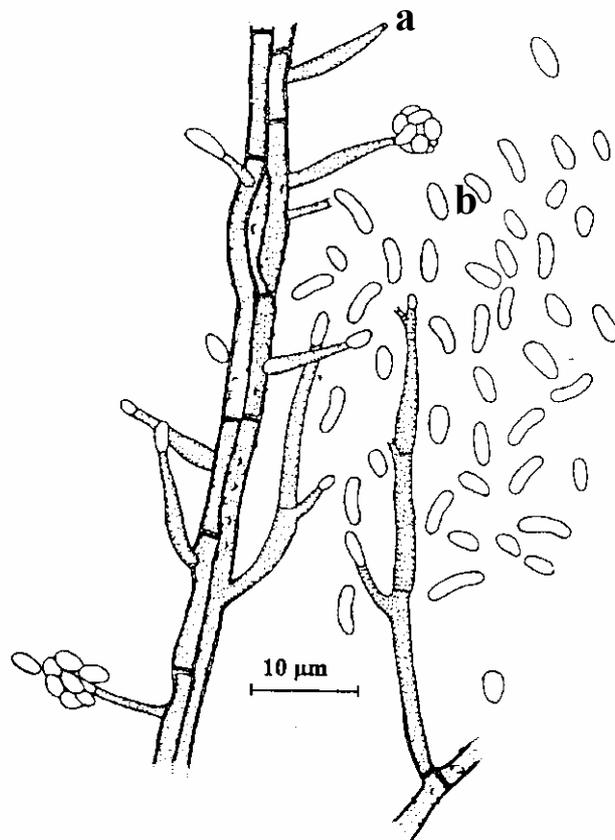


Figure 15 : Conidiophores (a) et conidies (b) de *Phaeoacremonium aleophilum* [68]

***Fomitiporia punctata* (P.Karst.)Murill**

Ce champignon appartient à la division des Basidiomycètes, à l'ordre des *Hyménochaetales* et à la famille des *Hyménochaetacées* (Dubos, 2002). Il se présente sur les troncs de ceps de vignes comme des coussinets irréguliers de quelques centimètres de diamètre (Figure 16). Aux stades les plus évolués, des régions fertiles creusées de pores sporifères se rencontrent à la surface des coussinets. Les basidiospores sont globuleuses, hyalines, lisses et leur diamètre varie de 5 à 6 μm . Les cultures de ce champignon sur malt gélosé sont blanches au début, deviennent très rapidement jaunes à ocre et présentent un aspect velouté. Le mycélium pousse de 4 à 5 cm de diamètre en deux semaines à 22°C [77].

***Stereum hirsutum* (Willd. : Fr.) S. F. Gray.**

Ce champignon appartient à la division des Basidiomycètes, à l'ordre des *Stéreales* et à la famille des *Stéreaées*. Il se caractérise par des fructifications aux lames coriaces, à bords retournés avec une pilosité caractéristique de la face supérieure et un hyménium orange à brun clair (Figure 17). Leur taille varie de 0,5 à 1,5 cm. Les Basidiospores sont hyalines, ellipsoïdes à cylindriques (5 à 7,5 x 2,9 à 3 μm). Ces fructifications n'apparaissent que rarement dans les vignobles. Les cultures de *Stereum hirsutum*, sur le milieu malt gélosé, présentent une croissance rapide, 5 à 6 cm par semaine à 22°C. Au fur et à mesure du vieillissement, la couleur varie du blanc vers le crème puis l'ocre. Les hyphes présentent des anses d'anastomose, leur longueur varie de 1,9 à 8 μm [64].



Figure 16: Carpophore de *Fomitiporia punctata*
[77]



Figure 17 : Carpophores de *Stereum hirsutum*
[1]

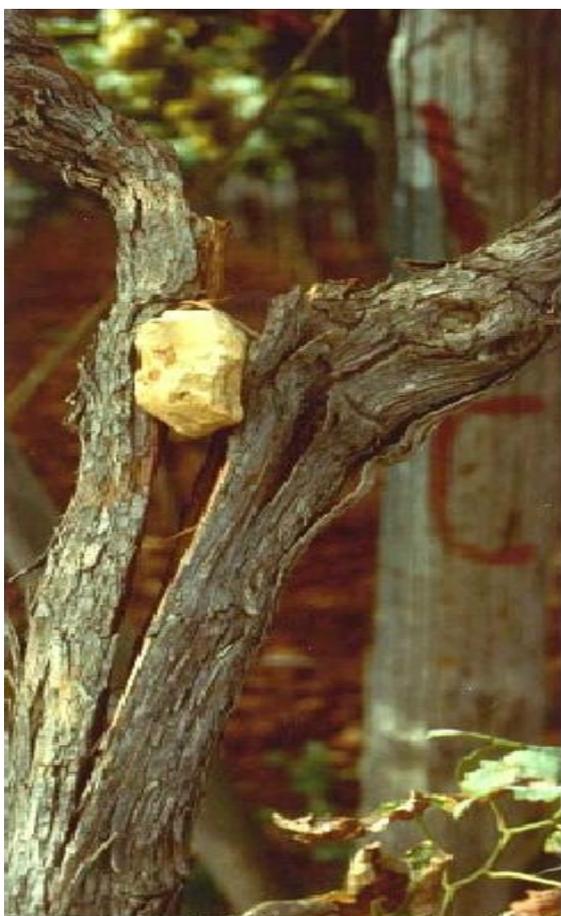


Figure 18 : Cep fondu au point de jonction des bras.
Pierre glissé permettant l'aération du cep
[54]

3.4.1 Cycle infectieux et mode d'action

L'identification des champignons associés à la maladie a beaucoup progressé, mais à l'exception d'*Eutypa lata*, très peu d'éléments nouveaux concernant leur biologie ont été publiés, notamment les formes de conservation, les formes de dissémination, les périodes de dissémination et les voies de contamination.

Des études réalisées sur la biologie des champignons pionniers, ont montré que pour *P. chlamydospora*, la plaie de taille semble être la voie principale d'entrer du parasite dans la plante. Des conditions hivernales douces, accompagnées d'une période pluvieuse, sont favorables à la dissémination et à la contamination des plaies de taille. Le *P. aleophilum* ne semble pas contaminer les plaies de taille, la source d'inoculum de ce champignon serait sur les parties excoriées du cep. Quant au mode de pénétration dans la plante, il demeure inconnu [94].

Ferreira *et al.*, [74]; Pasco et Cottral [92], pensent que les contaminations des bois a lieu en pépinières, lors de la propagation du matériel végétal. Les chlamydospores produits par *P. chlamydospora* qui se trouvent dans le sol sont susceptibles de causer des infections à partir du système racinaire [95, 54].

En ce qui concerne les champignons qui interviennent dans la seconde séquence parasitaire (*F. punctata* et *S. hirsutum*), ils se conservent sur les ceps dépéris, sous forme de carpophores. Mais il est probable que la majorité de l'inoculum provient du bois mort des espèces ligneuses forestières où les carpophores sont présents en quantité importante [1].

3.5. Facteurs influençant le développement de la maladie

3.5.1 Conditions climatiques

Comme pour l'eutypiose, le climat semble contribuer à l'expression des symptômes de l'esca. L'apoplexie se manifeste en été, souvent lorsqu'un temps chaud suit une pluie. Selon Dubos [1], l'évapotranspiration des vaisseaux du bois qui restent sans compensation par des apports d'eau, deviennent partiellement ou totalement non fonctionnels. Mugnai *et al.*, [54] proposent l'hypothèse d'une augmentation de la concentration en toxines lorsque l'évaporation est élevée. La forme lente de l'esca qui est absente durant la croissance printanière, et complètement visible en été [78]. C'est souvent l'alternance entre les périodes

sèches et pluvieuses, en plus de la présence de lésions causées par la grêle qui favorisent la pénétration de divers champignons [83].

Selon Galet [7], des températures de 20 à 30°C permettent d'expliquer l'importance de la maladie dans les zones méditerranéennes. Aussi Dubos [1] signale à ce propos que l'esca est plutôt une maladie des vignobles méditerranéens que des vignobles septentrionaux.

La quantité d'eau dans le sol ne semble pas être un facteur influençant le développement de la maladie, puisque dans le sud de l'Italie et en Californie, les vignobles de tables avec ou sans irrigations sont également susceptibles d'exhiber les symptômes de l'esca [54].

3.5.2 Cépages

La plupart des variétés de *Vitis vinifera* sont susceptibles à l'esca. Cette sensibilité est mal définie, mais semble à peu près identique à celle établie pour l'eutrophie [11]. Sparapano *et al.*, [96] ont comparé la sensibilité de deux cépages (Italia et Matilde) en inoculant *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeoconiella chlamydospora* et *Fomitiporia punctata*, individuellement et en combinaison, ils ont constaté que le cépage Italia est plus sensible aux différents champignons testés. Des symptômes au niveau des feuilles et sur les baies ont été visibles plus tôt, au bout de deux ans, sur le cépage Italia, aussi, la colonisation des tissus du bois est plus importante pour l'Italia que matilde.

3.5.3 Age de la vigne

L'esca a toujours été considérée comme étant une maladie des vignes âgées, cela est en relation avec le nombre de plaies de taille qui augmente avec l'âge de la vigne [1], cependant, des vignes âgées de 4 à 5 ans, peuvent présenter déjà des symptômes foliaires de l'esca. Sur les plants de 10 ans et plus que les symptômes et dommages deviennent plus apparents [54].

3.5.4 Mode de conduite

D'une façon générale et comme pour l'eutypiose, le mode de conduite qui cause de grosses plaies de taille crée les conditions idéales pour le développement de l'esca. Les travaux de par Lafon (1921) (in [54], ont montré que l'incidence de la maladie étant de 0,1 % pour les vignobles taillés en Cordon bilatéral et de 15 à 20 % pour ceux taillés en Guyot double. Selon Galet [2], les dommages causés par les gelées d'hiver, l'excoriose et les coupes

de taille sur les bras pour modifier le mode de conduite afin de s'adapter à la vendange mécanique, sont des facteurs favorables à l'extension de la maladie.

3.6. Méthodes de lutte

Le développement de stratégies de lutte efficaces contre l'esca, dépend principalement de la compréhension de la biologie et de l'épidémiologie de la maladie. Selon Di Marco *et al.*, [97], plusieurs caractéristiques de l'esca rendent l'efficacité des moyens de lutte encore plus difficiles, parmi elles :

- le type et le rôle des micro-organismes impliqués dans le processus d'infection.
- le temps nécessaire à l'apparition des symptômes foliaires.
- la corrélation entre les symptômes foliaires et la détérioration du bois.
- la nature erratique de la maladie.

La maîtrise de l'esca reste fondée sur la prévention qui réduit les pertes causées par la maladie et limite sa propagation.

3.6.1 Lutte préventive

➤ **Lutte prophylactique**

Elle est pratiquement similaire à celle proposée pour l'eutypiose. Elle intervient en premier lieu dès que l'on repère quelques ceps atteints, elle doit être systématique dans tous les vignobles.

Avant les vignerons Grecs utilisaient une méthode qui donnait de bons résultats et qui consistait à fendre le tronc des souches malades à la hache au point de jonction des bras et y glissait une pierre pour que la blessure ne se referme pas, puis procéder au curetage pour enlever l'amadou. L'aération de la plaie provoque la dessiccation des tissus et amène la destruction du champignon [2, 98] (Figure 18).

➤ **Lutte chimique**

De même que pour l'eutypiose, elle vise à stopper les manifestations de la maladie sur la végétation et ne présente pas d'effet curatif.

L'arsénite de sodium est le seul produit employé, depuis que son efficacité contre l'esca a été démontrée fortuitement au début des années 1920. Bien que le mode d'action des arsénites ne soit pas complètement élucidé, toutefois il limite la propagation de la maladie. Les arsénites sont pulvérisés sur le tronc et les branches principales à raison de 12,5 g/l et

appliqués durant deux années consécutives, au moins deux semaines après la taille et trois semaines avant le débourrement. Dès que les symptômes réapparaissent, le traitement sera repris [3, 54, 97, 1]. Il existe des spécialités commerciales additionnées d'une substance répulsive pour la faune sauvage (**Pyralesca RS**, **Pyraluminol**, **Pyral Rep Fort**) [99]. Mais à cause de sa toxicité pour l'environnement et l'utilisateur, l'arsénite de sodium, seul fongicide efficace, vient d'être retiré du marché phytosanitaire (2001), laissant les viticulteurs démunis face à la maladie [1].

De son côté, la recherche ne désarme pas et entrevoit d'autres solutions. Même si les résultats pratiques sont lointains et incertains, des essais en cours donnent des résultats encourageants, tel est le cas pour deux fongicides : **Cyproconazole** et **Fosetyl Al** appliqués à deux vignobles pendant une durée de quatre ans, et dont le taux de mortalité et l'apparition des symptômes ont nettement diminué [100].

3.6.2 Mesures curatives

Il n'existe, pratiquement aucune méthode de lutte curative. Cependant, nous pouvons envisager les mêmes techniques et conduites culturales, conseillées dans le cas de l'eutypiose, pour diminuer et ralentir la maladie [1].

➤ **Lutte biologique**

Les premiers essais de lutte biologique consistaient à appliquer une suspension de spores de *Trichoderma viride* dans une solution de glycérine à 3% sur les nouvelles plaies de taille, mais malheureusement les résultats restent non satisfaisants [54]. Di Marco *et al.*, [97], suggèrent l'utilisation de *Trichoderma harzianum*. Ils considèrent qu'il peut jouer un rôle important dans la lutte contre l'esca.

CHAPITRE 4

SYNOPTYQUE DES SITS DE SUIVI

4.1. Localisation géographique et caractéristiques climatiques

Notre étude a été réalisée au niveau de quatre régions, choisies essentiellement pour leur vocation viticole : Alger, Tipaza, Médéa et Mascara. Les superficies et la production viticole de chaque région ont été recueillies auprès des services de la production végétale du ministère de l'Agriculture (Annexe 2). Quant aux données climatiques, celles-ci proviennent de l'office national de la météorologie (ONM) de Dar-El-Beida. Elles concernent la dernière décennie (1994/1993) et elles permettent d'estimer les tendances climatiques de chacune des régions (Annexe 3).

4.1.1 Région d'Alger

La région d'Alger est située sur la bande littorale à 24 mètres d'altitude. La superficie viticole est de 1 468 ha pour la production exclusive de raisin de table. Nous avons retenu pour nos enquêtes et nos prélèvements deux localités : Ain-Benien qui se situe sur la bande littoral à une dizaine de kilomètres à l'ouest d'Alger et Ouled-Fayet qui se trouve à 12 Km au sud-ouest d'Alger.

4.1.2 Région de Tipaza

Tipaza est une région côtière située à 80 Km à l'ouest d'Alger. Ses vignobles couvrent une superficie de 3 767 ha dont 810 ha sont destinés à la production de raisin de cuve (21 640 qx) et 2 860 ha pour la production de raisin de table (185 460 qx). Notre choix s'est porté sur la localité de Hamr-El-Ain se situant, approximativement à 8 Km au sud de Tipaza.

4.1.3 Région de Médéa

Médéa est située sur l'Atlas tellien à 90 Km au sud-ouest d'Alger. La superficie viticole est de 6 904 ha pour une production de 161 760 qx de raisin de table et 20 370 qx de raisin de cuve. Nos observations et prélèvements sont effectués dans la localité de Benchicao. Elle est distante de Médéa d'une quinzaine de kilomètres et elle se trouve à une altitude de 1 200 mètres.

4.1.4 Région de Mascara

Mascara se situe à 474 mètres d'altitude. Elle se trouve à 380 Km à l'ouest de la capitale, comportant 7 005 ha de vignobles dont 4 007 ha pour la production de raisin de table, 2 754 ha pour la production du vin biologique et enfin, 60 ha pour la production de raisin destiné au séchage. Dans cette région, deux localités sont retenues, il s'agit de Mamounia et Ain-Faress, situées respectivement, à 3 Km et 6 Km au nord de Mascara.

4.2. Caractéristiques des parcelles étudiées

Les parcelles étudiées comportent un cépage blanc (2 parcelles) ou un cépage noir (six parcelles). Les cépages noirs Cinsault et Carignan de la région de Mascara sont cultivés pour la production du vin biologique. L'âge des parcelles est compris entre 12 et 50 ans, les plus jeunes se trouvent dans la région d'Alger et les plus âgés sont à Mascara. La superficie des parcelles varie de 2 à 33 ha. La densité de plantation diffère d'une parcelle à une autre. Elle varie de 1 à 1,5 mètres entre les ceps et de 2 à 3 mètres entre les rangs. Deux modes de conduite sont adoptés : le gobelet et le cordon double. Ce dernier a été dans certaines parcelles précédé par un mode de conduite en gobelet. Le 41B est le seul porte-greffe utilisé pour certaines parcelles, les autres sont constitués de francs pieds. L'arsénite de sodium a été utilisé dans plusieurs parcelles sous forme de Pyralesca (tableau 3).

Tableau 3 : Différentes caractéristiques des parcelles

Régions	ALGER			TIPAZA	MEDEA		MASCARA	
Localité	Ouled-fayet	Ain-Benien		Hamr-El-Ain	Benchicao		Ain-Faress	Mamounia
Cépage	Cardinal	Alphonse lavallée	Cardinal	Dattier de B.	Cinsault	Dattier de B.	Cinsault	Carignan
Porte-greffe	Franc	41B	41B	Franc	41B	41B	Franc	Franc
Age (an)	22	12	12	13	28	20	43	50
Superficie (ha)	7	4	4	11	2	6,25	8	33
Densité de plantation(m)	1 x 3	1,5x 2.5	1,5 x2.5	1 x 3	1,3 x 2,7	1,3 x 2,7	1 x 2	1 x 2
Date de la taille	Déc.	Janv.	Janv.	Nov.	Déc.	Déc.	Déc.	Déc.
Mode de conduite	Cordon double	Cordon double	Cordon double	Cordon double	Cordon double	Cordon double	Gobelet	Gobelet
Transformation de la taille	+	+	+	-	+	-	-	-
Traitement à l'arsénite	-	+	+	+	+	-	-	-

+ : oui

- : non

CHAPITRE 5

EVALUATION DES DEPERISSEMENTS DANS LES VIGNOBLES

5.1. Méthodologie des enquêtes

L'évaluation de l'eutypiose et de l'esca dans les différents vignobles s'est déroulée sous forme d'une enquête qui comporte une observation directe des symptômes sur le terrain, complétée par un questionnaire soumis aux exploitants des parcelles observées (Annexe 4). L'objectif du questionnaire est de cerner les facteurs qui peuvent avoir une influence sur le développement de ces maladies, en particulier : le mode de conduite, la période de la taille et le porte-greffe (Tableau 3).

5.1.1 Choix des parcelles et échantillonnage

Dans les différentes régions viticoles citées précédemment, des vignobles présentant des symptômes de dépérissement ont été ciblés.

La constitution des échantillons de ceps à observer dans chacune des parcelles a été réalisée aléatoirement. Des études préalables [46, 1], ont montré que l'eutypiose et l'esca n'obéissent à aucune loi apparente de répartition dans la parcelle. Selon ces auteurs, le tirage aléatoire représente la manière la plus objective de choisir les ceps à observer.

Dans chaque vignoble nous avons constitué cinq unités parcellaires. Chacune d'elles est représentée par 100 ceps repartis sur une surface carrée comportant 10 ceps sur 10. Ainsi, pour chaque parcelle, l'observation a porté sur 500 ceps, soit un total atteignant 4 000 ceps pour les huit vignobles prospectés. Pour nos observations et prélèvement, nous avons éliminé les ceps de bordures. Afin de repérer facilement chaque unité, nous avons procédé au marquage de chaque série de 10 ceps.

5.1.2 Observations et notations des symptômes

L'état sanitaire du cep est noté sur une fiche d'observation. La première notation a été effectuée à la fin du mois de Mai, ce qui a permis de repérer les symptômes d'eutypiose avant d'être masqués ensuite par le développement végétatif de la vigne. La deuxième observation a

été réalisée au mois d’Août, période à laquelle les symptômes d’esca sont plus visibles (tableau 4).

Tableau 4 : Date des observations effectuées dans les parcelles

Localités	Observations 1	Observations 2
Ouled-Fayet	07/06/2003	16/08/2003
Ain-Benien	05/06/2003	17/08/2003
Hamr-El-Ain	30/05/2003	10/08/2003
Benchicao	28/05/2003	10/08/2003
Ain-Faress	21/05/2003	13/08/2003
Mamounia	21/05/2003	13/08/2003

5.1.2.1 Echelle d’évaluation de l’eutypiose

La méthodologie suivie est celle décrite par le groupe de travail «Eutypiose-charentes » pour le suivi de l’eutypiose en France et en Europe, elle a été simplifiée par Péros [44]. Sa particularité réside dans la prise en compte des ceps présentant des anomalies (partie ou totalité du bras mort, courson sans végétation, végétation affaiblie). Cette méthode se compose d'une échelle d'évaluation de cinq indices, allant de l'indice 0 pour les ceps sains à l'indice 4 pour les ceps morts (tableau 5).

Tableau 5 : Echelle d'évaluation des symptômes d'eutypiose [44]

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

5.1.2.1.1 Incidence de l'eutypiose

L'évaluation de l'importance réelle de l'eutypiose a été faite par rapport au nombre de pieds vivants. Ainsi, selon Péros [44], l'incidence de l'eutypiose correspond au pourcentage de ceps vivants notés 2 et 3 selon l'échelle, par rapport aux ceps totaux observés soustraits des ceps morts.

$$\text{Incidence (\%)} = (\text{ceps notés 2} + \text{ceps notés 3}) / (\text{ceps observés} - \text{ceps morts})$$

5.1.2.1.2. Indice de dépérissement de l'eutypiose

Cet indice permet d'évaluer l'altération globale du potentiel de production de la parcelle. Il est calculé selon la formule suivante [44].

$$\text{ID} = \sum \text{ni} \cdot \text{i} / (4 \cdot \text{N}) \cdot 100$$

ID : indice de dépérissement.

ni : étant le nombre de ceps recevant la note i (i = 0 à 4).

N : est le nombre total de ceps observés.

4 : l'indice le plus élevé de l'échelle.

5.1.2.2. Echelle d'évaluation de l'esca

Les symptômes ont été évalués selon l'échelle de notation proposée par Jamaux-Déspréaux *et al.*, [91]. Elle est composée de quatre indices (tableau 6).

Tableau 6 : Echelle de notation des symptômes d'esca.

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

5.1.2.2.1 Incidence de l'esca

L'incidence correspond au pourcentage de ceps notés 1 et 2 selon l'échelle de Jameaux-Déspréaux *et al.*, [99], par rapport aux ceps totaux observés soustraits de ceps morts :

$$\text{Incidence (\%)} = (\text{ceps notés 1} + \text{ceps notés 2}) / (\text{ceps observés} - \text{ceps morts}).$$

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

CHAPITRE 6

RECHERCHE ET ISOLEMENT DES CHAMPIGNONS IMPLIQUES DANS LE DEPERISSEMENT

6.1. Prélèvement des ceps à analyser

Dans chacune des parcelles, en dehors des unités parcellaires (placettes) observées pour l'incidence des dépérissements, 10 ceps présentant les symptômes typiques cités (tableaux 5 et 6) sont sectionnés à la base du tronc, soit un total de 80 ceps. Les symptômes de chaque cep sont notés dans le but de les comparer aux différentes nécroses retrouvées dans les troncs et les bras.

6.2. Isolement des champignons

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

6.2.1 Désinfection et isolement des bûchettes

La désinfection ainsi que l'isolement ont été réalisés, en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire selon la technique décrite par Péros et Berger [21]. Afin d'éliminer les contaminants de surface, les bûchettes ont été plongées dans un pilulier contenant une solution d'hypochlorite de sodium à 8° pendant 15 mn. Les bûchettes sont ensuite rincées trois fois consécutives à l'eau stérile et posées sur du papier stérile pour le séchage.

Les coupes des bûchettes sont rafraîchies à l'aide d'un scalpel, puis sont disposées par cinq dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Annexe 5a), scellées avec du parafilm et mises en incubation à 25°C à l'obscurité.

6.2.2 Observations et repiquages

L'observation des boîtes se fait tous les deux à trois jours. A chaque fois qu'un mycélium se développe, celui-ci est repiqué sur le milieu PDA. Les bûchettes encore stériles, sont quant à elles, transférées dans d'autres boîtes de Pétri afin d'éviter qu'elles ne soient à leur tour envahies par le mycélium des autres bûchettes.

Cette opération dure deux mois, temps nécessaire au développement de tous les champignons à croissance lente. Il est à noter qu'une bûchette peut laisser développer jusqu'à plus de trois champignons différents, alors que d'autres peuvent rester stériles.

CHAPITRE 7

IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE ET MOLECULAIRE DES ISOLATS

7.1. Identification des isolats

De nombreux microorganismes ont été isolés à partir des différentes nécroses observées, mais ne sont retenus que les champignons fréquemment isolés [4, 22]. D'après ces auteurs, ce sont ces champignons qui sont incriminés dans les dépérissements. Dans le but de les identifier, nous avons procédé à leurs purifications par des repiquages successifs sur le milieu PDA, jusqu'à l'obtention de cultures pures.

Dans un premier temps, une caractérisation morphologique des isolats a été réalisée selon deux critères : les caractères macromorphologiques ainsi que l'aspect micromorphologique des culturaux. Afin de confirmer l'identité des champignons pionniers de l'esca, les isolats ont été caractérisés par une technique moléculaire de diagnostic (Polymerase Chain Reaction : la PCR).

7.1.1 Caractérisation morphologique des isolats fongiques

7.1.1.1 Caractères culturaux

Ils tiennent compte du type de croissance des colonies, de la couleur et de la texture du mycélium, ainsi que la pigmentation du substrat. Ils sont étudiés sur des cultures pures âgées d'une quinzaine de jours à un mois sur le milieu PDA, incubées à une température de 25°C et à l'obscurité.

7.1.1.2 Aspect microscopique

Les principaux caractères microscopiques tels que les caractéristiques des conidies, la nature des hyphes mycéliens et la présence des fructifications, ont été visualisées sous microscope optique aux grossissements 10 x 10 et 40 x 10. Des photos des différentes caractéristiques sont prises à l'aide d'un microscope muni d'un appareil à photo « Olympus BH2 ».

A partir de cultures pures ; une dizaine de pastilles mycéliennes d'environ 5 mm de diamètre, sont mises dans des microtubes contenant 1 ml d'eau stérile et conservés à une température de 4°C.

7.1.1.3 Détermination des espèces

Pour la détermination des différents isolats, Cinq souches de références, représentant les principales espèces fongiques incriminées dans le dépérissement de la vigne, ont été utilisées. Elles proviennent de la mycothèque du laboratoire de l'unité mixte de recherche : Diversité et génomes des plantes cultivées (UMR DGPC) de l'institut nationale de recherches agronomiques de Montpellier (tableau 7).

Tableau 7 : Principales caractéristiques des isolats de référence

Champignons	Référence	Cépage	Origine (France)	Date d'isolement
<i>Eutypa lata</i>	LC 405	Ugni blanc	St.Laurant C.	1996
<i>Fomitiporia punctata</i>	LR6	Mauzac	Antugnac	1996
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	LR25	Cinsault	Languedoc-R.	1999
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	LR20	Cinsault	Languedoc-R.	1999
<i>Phomopsis viticola</i>	PHO.4	Cinsault	Languedoc-R.	1999

7.2.2 Identification par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Cette opération a été réalisée au laboratoire de l'UMR DGPC de l'Institut Nationale de Recherches Agronomiques de Montpellier.

La PCR est une technique de choix pour la détection et l'identification des champignons pathogènes, de manière spécifique. Elle est basée sur l'amplification de certaines régions du génome à partir d'un couple d'amorces spécifiques. C'est une technique fiable et rapide et a déjà constitué une aide précieuse pour le diagnostic d'*Eutypa lata*, agent de l'eutypiose de la vigne, en culture et dans le bois [102].

L'application de la PCR spécifique est intéressante pour l'identification des deux champignons pionniers de l'esca, *P. chlamydospora* et *P. aleophilum*, dont la croissance est lente et demande plusieurs jours à plusieurs semaines avant qu'ils soient reconnaissables sur les milieux de culture. Aussi, la plupart du temps, des levures et des champignons saprophytes à croissance rapide se développent avant eux.

7.2.2.1 Matériel fongique et génomique

Les différents champignons conservés ont été repiqués en prélevant de chaque microtube un disque mycélien. Ce dernier est transféré au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar, Difco, USA) (Annexe 5b). Aussi, nous avons sélectionné les isolats et les extraits d'ADN (acide désoxyribonucléique) de champignons conservés au congélateur depuis plusieurs mois. Ils proviennent également de la collection de l'UMR DGPC.

Les références utilisées pour désigner nos isolats indiqués dans les tableaux 8, 9 et 10, comportent des chiffres et des lettres. La première lettre correspond à la parcelle où le prélèvement a été effectué, le chiffre indique le numéro du cep prélevé (allant de 1 à 10 pour chaque parcelle) et la dernière lettre correspond à la nécrose où l'isolement a été effectué.

Tableau 8 : Principales caractéristiques des isolats et de l'ADN d'*Eutypa lata*

Référence	Cépage	Origine	Date d'isolement
S1a	Cinsault	Ain-Faress (Mascara)	2003
S2b	Cinsault	Ain-Faress (Mascara)	2003
S4a	Cinsault	Ain-Faress (Mascara)	2003
S5a	Cinsault	Ain-Faress (Mascara)	2003
S6a	Cinsault	Ain-Faress (Mascara)	2003
B1a	Cinsault	Benchicao (Médéa)	2003
B6a	Cinsault	Benchicao (Médéa)	2003
B8a	Cinsault	Benchicao (Médéa)	2003
B10a	Cinsault	Benchicao (Médéa)	2003
H1a	Dattier de Beyrouth	Hamr-el-Ain (Tipaza)	2003
H3c	Dattier de Beyrouth	Hamr-el-Ain (Tipaza)	2003
H6c	Dattier de Beyrouth	Hamr-el-Ain (Tipaza)	2003
K6a	Dattier de Beyrouth	Benchicao (Médéa)	2003
LC405 *	Ugni blanc	St.Laurant Cognac	1996
ADN Bx1-10*	CabernetSauvignon	Bordeaux (France)	1990

* : les souches isolées en France et utilisées comme témoins (Tableaux 8, 9 et 10).

Tableau 9 : Principales caractéristiques des isolats et de l'ADN de *Ph. chlamydospora*

Référence	Cépage	Origine	Date d'isolement
C2b	Cardinal	Ain- Benien (Alger)	2003
M4b	Carignan	Mamounia (Mascara)	2003
S7b	Cinsault	Ain-Faress (Mascara)	2003
K8b	Dattier de Beyrouth	Benchicao (Médéa)	2003
K7c	Dattier de Beyrouth	Benchicao (Médéa)	2003
B9a	Cinsault	Benchicao (Médéa)	2003
H2b	Dattier de Beyrouth	Hamr-el-Ain (Tipaza)	2003
F9e	Cardinal	Ouled-fayet (Alger)	2003
A2a	Alphonse lavallée	Ain- Benien (Alger)	2003
A1c	Alphonse lavallée	Ain- Benien (Alger)	2003
B2a	Cinsault	Benchicao (Médéa)	2003
S5c	Cinsault	Ain- Faress (Mascara)	2003
ADN*	Ugni-blanc	Montpellier	1996

Tableau 10 : Principales caractéristiques des isolats et de l'ADN de *Ph. aleophilum*

Référence	Cépage	Origine	Date d'isolement
B2a	Cinsault	Benchicao (Médéa)	2003
B4c	Cinsault	Benchicao (Médéa)	2003
H2a	Dattier de Beyrouth	Hamr-el-Ain (Tipaza)	2003
H3a	Dattier de Beyrouth	Hamr-el-Ain (Tipaza)	2003
H5b	Dattier de Beyrouth	Hamr-el-Ain (Tipaza)	2003
F7c	Cardinal	Ouled-fayet (Alger)	2003
F3a	Cardinal	Ouled-fayet (Alger)	2003
K3b	Dattier de Beyrouth	Benchicao (Médéa)	2003
K10b	Dattier de Beyrouth	Benchicao (Médéa)	2003
S3b	Cinsault	Ain-faress (Mascara)	2003
A5b	Alphonse lavallée	Ain-Benien (Alger)	2003
M5a	Carignan	Mamounia (Mascara)	2003
ADN*	Ugni-blanc	Montpellier	1996

7.2.2.1.1 Extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait à partir de mycélium d'*Eutypa lata*, de *Phaeomoniella chlamydospora* et *Phaeoacremonium aleophilum* en phase de croissance, âgé d'environ un mois. Le prélèvement du mycélium a été réalisé par grattage à la surface de la gélose à l'aide d'un scalpel, sous une hotte à flux laminaire. Deux à trois pointes de scalpel sont suffisantes pour les deux protocoles utilisés pour l'extraction.

➤ **Protocole d'extraction par choc thermique selon Lecomte *et al.*, [102].**

C'est un protocole simple à réaliser, il a été utilisé pour l'extraction des ADN de :

13 isolats d'*Eutypa lata* (tableau 8)

10 isolats de *Phaeomoniella chlamydospora* (tableau 9)

10 isolats de *Phaeoacremonium aleophilum* (tableau 10)

Pour chaque isolat, le mycélium a été déposé dans un tube eppendorf de 0,5 ml contenant 25 µl d'eau stérile. Les tubes ont été placés dans un thermocycleur pendant 15 min à 90°C, puis mis dans de la glace.

➤ **Protocole d'extraction à l'aide d'un KIT d'extraction : KIT QUIAGEN**

Il a été utilisé pour l'extraction des ADN de deux isolats (B2a et S5c) de *Phaeomoniella chlamydospora* et deux isolats (K10b et M5a) de *Phaeoacremonium aleophilum*. Les tubes des isolats ont été doublés afin d'avoir deux séries :

- Une première série a été testée avec le Glucanex (produit favorisant l'éclatement des cellules).
- Une deuxième série, a été testée sans Glucanex.

Pour chaque isolat, avec le scalpel, 2 à 3 pointes de mycélium ont été mises dans un tube eppendorf de 0,5 ml contenant 25 µl d'eau stérile.

- Mettre 1 ml de Glucanex (Annexe 6) dans les tubes de la première série à 37°C.
- Centrifuger 10 min à 12000 g à une température ambiante.
- Jeter le surnageant
- Sur le culot, déposer 400 µl de tampon AP1 à 65°C et 4 µl de Rnase et vortexer fortement.
- Laisser le mélange pendant 10 min au bain Marie à 65°C en agitant deux à trois fois.
- Ajouter 130 µl de tampon AP2 puis vortexer et laisser 5 min dans la glace.

- Centrifuger 10 min à 12000g et prélever le surnageant et mettre dans la colonne lilas du KIT.
- Jeter la colonne lilas et garder le tube blanc transparent et prélever 450 µl du filtrat.
- Déposer dans un nouveau tube d' 1,5 ml (non fourni) et ajouter 650 µl de AP3/ E.
- Mélanger à l'aide de la pipette.
- Déposer 650 µl de ce mélange dans la colonne blanche du KIT.
- Centrifuger 1 min à 12000 g, jeter le filtrat.
- Prélever le reste du mélange et déposer à nouveau dans la colonne blanche.
- Centrifuger 1 min à 12000g, jeter le filtrat.
- Mettre la colonne blanche Dans un nouveau tube (fourni dans le KIT).
- Ajouter 500 µl de tampon AW et centrifuger 1 min à 12000 g.
- Mettre la colonne dans un tube eppendorf de 1,5 ml.
- Ajouter 100 µl de tampon AE préchauffé à 65°C.
- Laisser incubé 5 min à température ambiante et centrifuger 1 min à 12000g.

7.2.2.1.2 Conditions d'amplification de l'ADN

Trois couples d'amorces ont été utilisés pour tester les différents isolats. Ils ont été déterminés à partir de fragments amplifiés par RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Les couples d'amorces choisis pour tester les isolats de *P. chlamydospora* et *P. aleophilum* ont été sélectionnés par Péros de l'INRA de Montpellier et synthétisés par GIBCO BRL. Quant au couple d'amorces utilisé pour tester les isolats de *E. lata*, il a été synthétisé par life Technologies SARL (Eragny, France).

La séquence, la température d'hybridation et la taille du fragment spécifique sont présentées dans le tableau 11.

Tableau 11 : Caractéristiques des amorces

Couple d'amorces désigné pour l'amplification de l'ADN d'*E. lata*

Couple d'amorces	Séquence 5' _3'	Origine génomique	Température de fusion	Taille du fragment
SCAB 02A	AAT CGA TGT GAG AGA TGG	Fragment	55 °C	700 pb
SCAB 02B	AGG TCA ATG ATA GCC AAC	RAPD		

Couple d'amorces désigné pour l'amplification de l'ADN de *P. chlamydospora*

Couple d'amorces	Séquence 5' _3'	Origine génomique	température de fusion	Taille du fragment
PCC08	ACC TGA TAC GTA AGC ATA CTC	Fragment	55 °C	237 pb
	CCT GTA GAC CAT CTC TTG TTTC	RAPD		

Couple d'amorces désigné pour l'amplification de l'ADN de *P. aleophilum*

Couple d'amorces	Séquence 5' _3'	Origine génomique	température de fusion	Taille du fragment
PAP01	ACT CCA ACC TAG CTG TGA TG	Fragment	55 °C	540 pb
	CTC CAA TGT GAA TGG GCA AG	RAPD		

Préparation de la solution du couple d'amorces d'*E. lata*

La préparation du couple d'amorces (SCB 02A / SCB 02B) est présentée dans l'annexe 7.

Préparation du mélange réactionnel (le mix)

Les amplifications ont été effectuées dans un volume final de 20 µl (15 µl du mix + 5µl d'échantillon). Sous hotte, la préparation a été réalisée dans des microtubes de 100 µl où ont été mélangés :

- 6,8 µl d'eau
- 0,2 µl de Taq Polymérase

- 2 μ l de tampon
- 1 μ l de DNTP (désoxy nucleotidyl tri phosphate)
- 5 μ l du mélange des deux amorces (Annexe 7)
- 5 μ l de la suspension d'ADN à tester

Des micro-pipettes Pipetman ® munies d'embouts stériles ont été utilisées pour déposer les quantités requises. Une fois le mélange réalisé, nous avons homogénéisé par agitation au vortex et nous avons centrifugé brièvement les tubes. Ils ont été maintenus dans de la glace pilée afin d'éviter toute dégradation des réactifs. Un témoin a été aussi préparé contenant l'ensemble du mélange, hormis l'ADN.

Les échantillons ont été ensuite, recouverts d'une goutte d'huile minérale afin d'éviter toute évaporation du mélange réactionnel lors des cycles d'amplification.

Programme d'amplification sur le thermocycleur PTC-10 (MJ Research, Watertown, MA, USA)

La PCR consiste à une succession de 37 cycles, chacun comporte trois étapes thermiques :

- Dénaturation de l'ADN durant 30 secondes à 95°C.
- Appariement des amorces durant 1 min à 55°C (température spécifique du couple d'amorce utilisé).
- Elongation des amorces pendant 1 min 30 secondes à 72°C.

7.2.2.1.3 Visualisation des produits de l'amplification

Les fragments d'ADN obtenus par amplification ont été séparés par électrophorèse selon leur taille dans un gel d'Agarose à 1,2%.

Préparation du gel d'Agarose

Dans un Erlen de 100 ml, verser :

- 25 ml de tampon tris borate E.D.T.A (TBE) concentré 0,5x.
- 300 mg d'Agarose.
- Porter à ébullition (peser la solution avant et après et compléter à l'eau s'il y a évaporation).
- Couler le gel pas trop chaud dans une cuve mupid.

Pour visualiser le front de migration, 2,5 µl de bleu de bromophénol-glycérol ont été ajoutés à chaque échantillon. Il alourdit aussi le mélange, ce qui facilite les dépôts (bien mélanger).

Dans chaque puit du gel, 5 µl du produit d'amplification ont été déposés. Nous avons également déposé marqueur de taille (1 Kb) aux deux puits situés aux extrémités du gel afin d'estimer la taille des fragments d'ADN.

Un courant électrique de 100V entraîne la migration de l'ADN qui est chargé négativement vers la cathode (+).

Une fois l'électrophorèse terminée, le gel d'Agarose est déposé dans un bain de BET (Bromure d'Ethidium) pendant environ 10 min. le BET s'intercale entre les bases de l'ADN et émet une fluorescence sous U.V. ainsi, il permet de visualiser les fragments d'ADN séparés par l'électrophorèse (Ce produit est très dangereux, il nécessite beaucoup de précautions).

Le gel est photographié et une image papier est ainsi obtenue.

CHAPITRE 8

RESULTATS DES ENQUETES SUR LE TERRAIN

8.1. Symptomatologie

Dans l'ensemble des vignobles prospectés, les symptômes sur les parties herbacées ont constitué la manifestation la plus évidente de la présence de l'esca et de l'eutypiose. En plus, d'autres symptômes de dépérissement ont pu être distingués et pris en considération.

Les observations effectuées durant la période printanière ont surtout révélé la présence de :

➤ **Symptômes d'eutypiose** : se manifestant par un rabougrissement de la végétation avec un aspect buissonnant (Figure 19). Les feuilles sont petites, enroulées ou déformées, parfois jaunâtres et nécrosées sur le bord (Figure 20). Ces symptômes ont été observés sur le cep entier ou uniquement sur un seul bras. Dans le dernier cas, les autres bras présentent un feuillage normal, ce qui masque le bras infecté au fur et à mesure que la végétation se développe (Figure 21). Ce genre de symptômes a été décrit, comme étant des symptômes typiques engendrés par les attaques de l'eutypiose particulièrement, dans les travaux de Bolay [29], Carter et Moller [50] et Dubos [24, 25].

➤ **Bras mort** : parfois les ceps présentaient uniquement un bras mort, alors que le reste de la souche se développe normalement (Figure 22).

➤ **Mortalité** : dans certains cas, un nombre important de ceps complètement dépéris a été observé particulièrement dans le vignoble de la localité d'Ouled-Fayet (Alger) (Figure 23). Des symptômes similaires ont été signalés par Mur et Branas [26] et Munkvold *et al.*, [19].



Figure 19 : Symptôme d'eutiopie sur les parties herbacées.



Figure 20 : Aspect rabougri des rameaux feuilles petites et chlorosées.



Figure 21 : Symptôme d'eutiopie sur un seul bras (a)



Figure 22 : Cep avec un bras mort (a) Développement normale du reste de la souche (b)



Figure 23 : Nombre important de ceps dépéris

Les observations effectuées durant la période estivale, ont révélé la présence de :

➤ **L'esca** : le complexe symptomatologique connu pour cette maladie, sous ses formes lente et foudroyante (Figures 24 et 25), a été observé dans la plupart des localités prospectées . Ces altérations ont été localisées sur une partie et parfois sur la totalité du cep. Des observations similaires ont été rapportées par Mugnai *et al.*, [54]; Edwards *et al.*, [85] et Stamp [80].

Dans le cas de la forme lente, les feuilles de la base sont souvent atteintes en premier, montrant des dessiccations internervaires, donnant un aspect marbré au feuillage. Les nécroses sont entourées d'un liseré jaune chez les cépages blancs (Figure 27) et un liseré rouge chez les cépages noirs (Figure 26).

Les grappes sont également touchées, les baies restent petites et mûrissent mal ou bien elles se dessèchent (Figure 28a). Un autre type de symptômes a été observé au niveau de la parcelle du Dattier de Beyrouth de Hamr-El-Ain (Tipaza), où les baies montrent de nombreuses tâches ponctiformes de couleur variant du brun au noir (Figure 28b). Ce type de symptômes a été observé en Californie [61] et en Italie [54].

Aussi, un dessèchement partiel ou total des ceps a été constaté. Dans ce cas, les ceps atteints sont souvent chargés de fruits qui se dessèchent moins vite que les feuilles et les extrémités des pousses (Figure 29).

Il est également important de signaler la présence, dans la parcelle d'Ouled-Fayet (Alger), de ceps qui présentent à la fois, les deux types de symptômes au niveau de la végétation (rabougrissement dans le cas de l'eutypiose et marbrure des feuilles dans le cas de la forme lente de l'esca). Selon Larignon [4], ce type de symptômes pourraient être attribués à *Eutypa lata* qui se développe dans le bois brun en position sectorielle et aux autres champignons pionniers (*P.chlamydospora* et *P.aleophilum*), qui sévissent dans la nécrose brune en position centrale.



Figure 24 : Forme apoplectique de l'esca
dessèchement brutal du cep

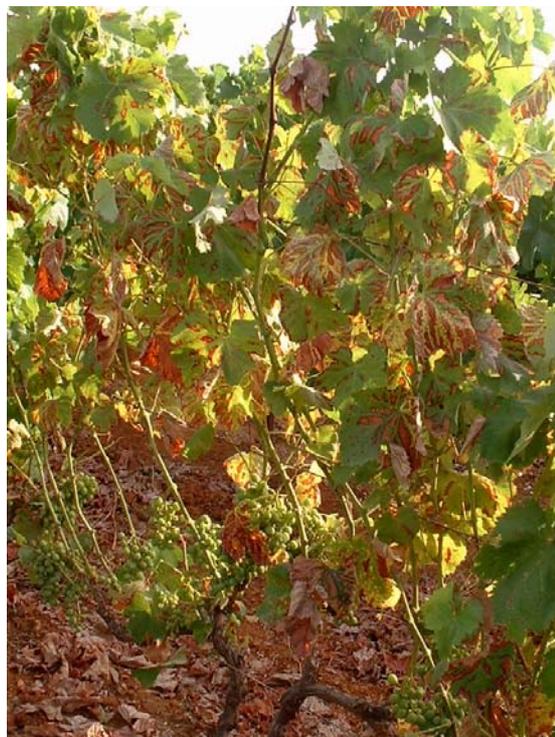


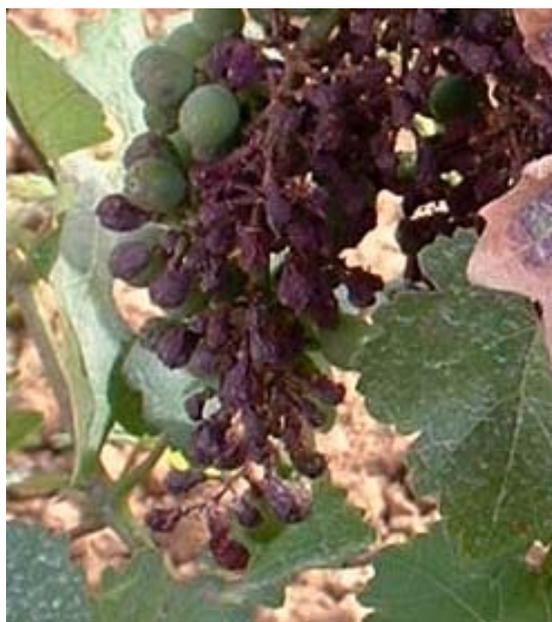
Figure 25: Forme lente de l'esca



Figure 26 : Symptômes sur feuille
de cépage noir



Figure 27 : Symptômes sur feuilles de
cépage blanc



a) Dessèchement de la grappe



b) Présence de tâches brunes ponctiformes sur les baies

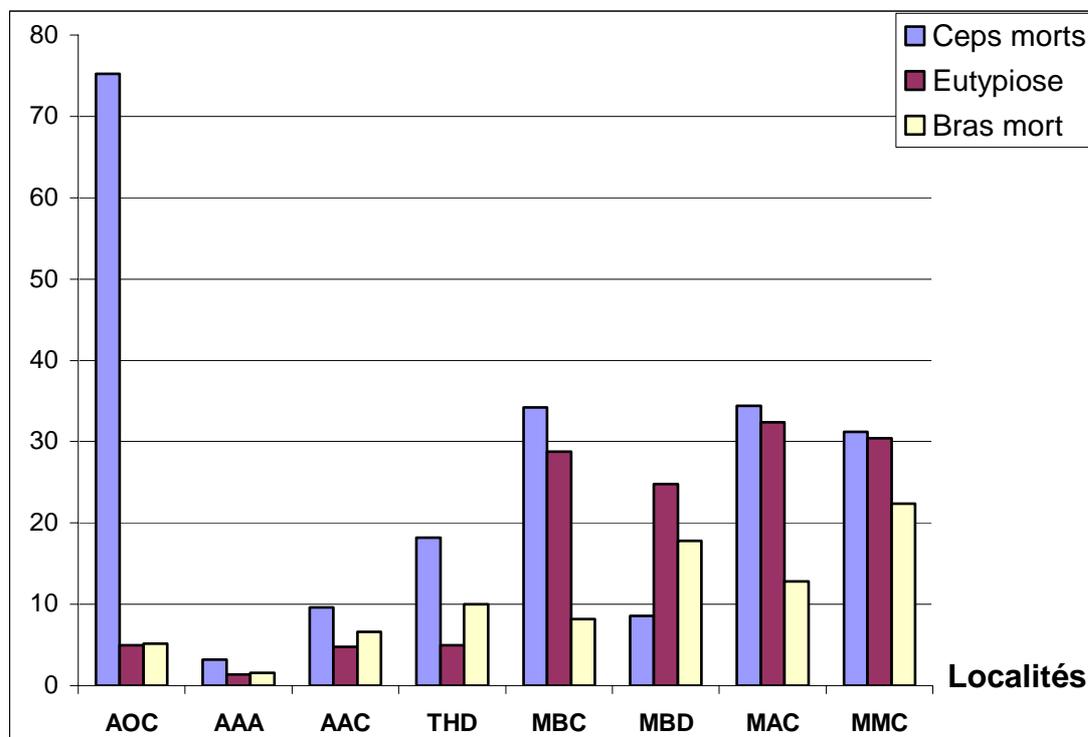
Figure 28 : Symptômes d'esca sur fruits



Figure 29 : Dessèchement brutal d'un cep chargé de fruits

8.2. Etat des dépérissements au niveau des vignobles

8.2.1. Evaluation de l'eutypiose, de la mortalité et des bras morts



AOC : Alger, Ouled-Fayet, Cardinal
AAC : Alger, Ain-Benien, Cardinal
MBC : Médéa, Benchicao, Cinsault
MAC : Mascara, Ain-Faress, Cinsault

AAA : Alger, Ain-Benien, Alphonse-Lavallé
THD : Tipaza, Hamr-El-Ain, Dattier de Beyrouth
MBD : Médéa, Benchicao, Dattier de Beyrouth
MMC : Mascara, Mamounia, Carignan

Figure 47 : pourcentage de ceps morts, présentant des symptômes d'eutypiose et des bras morts (%).

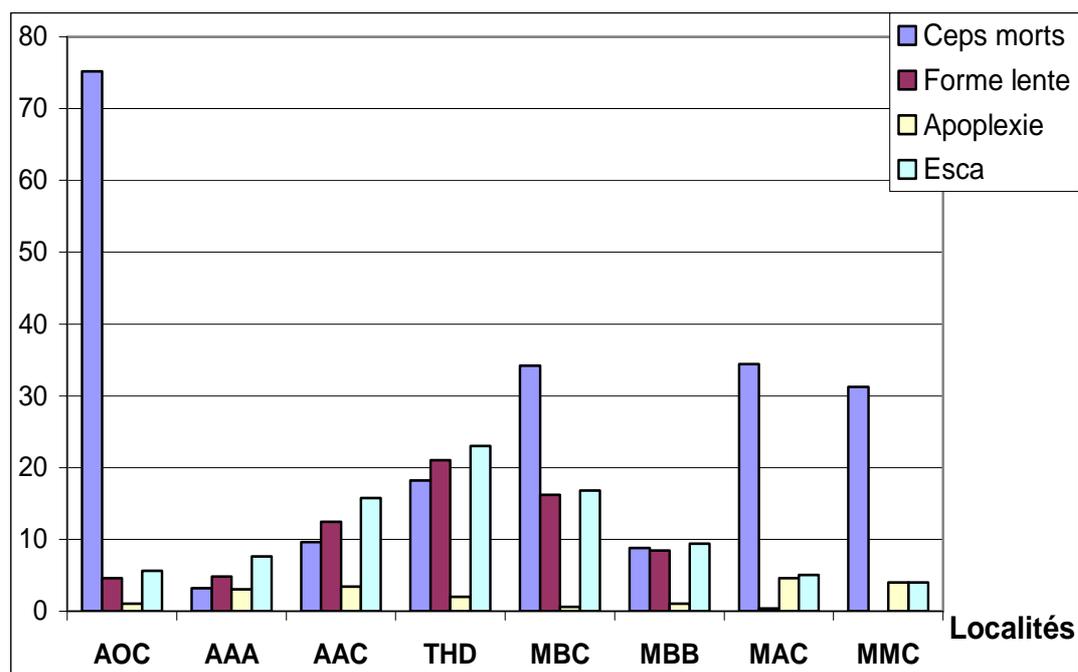
La mortalité des ceps observés dans les différents vignobles prospectés, varie de 3,2% à 75,2%. La gravité a été constatée à Ouled-fayet (Alger) par contre que, c'est la parcelle de Ain-Benien (variété Alphonse-Lavallée) qui présente le taux le plus réduit. Des taux de mortalité dépassant 30% ont été observés dans les vignobles de Ain-Faress, de Mamounia (Mascara) et à Benchicao (variété Cinsault) (figure 47). Il est bien évident que la mortalité témoigne de l'existence de phénomènes de dépérissements, mais ne traduit pas seulement l'importance de l'eutypiose ou de l'esca. Malgré que ces maladies conduisent en effet à plus ou moins long terme, à la mort certaine des ceps [44, 25, 10, 102].

Les symptômes typiques de l'eutypiose, ont été observés surtout dans les localités de Ain-Faress et Mamounia (Mascara), avec respectivement 32,4% et 30,4%. L'expression de

ces symptômes a été aussi importante au niveau des deux parcelles de Benchicao (Médéa) où le taux atteint 28,8%. Contrairement aux parcelles de Hamr-El-Ain (Tipaza), de Ain-Benien et Ouled-Fayet (Alger), où les taux sont bien inférieurs, variants de 1,4% à 5% (figure 47). Comparé à certaines régions de la France, l'expression des symptômes de l'eutypiose au niveau de nos parcelles est aussi importante. Des enquêtes portant sur l'observation des symptômes dans six régions françaises ont montré que la maladie est présente dans toutes les régions avec des taux qui varient de 0,3% à 34,6% [11].

La présence du bras mort au niveau des ceps a été observée au niveau des parcelles où le taux d'expression des symptômes d'eutypiose est important, c'est-à-dire les parcelles de Mamounia et Ain-Faress à Mascara et de Benchicao à Médéa. Ce constat laisse suggérer que l'eutypiose pourrait être la cause de la présence du bras mort au niveau des ceps. Munkvold *et al.*, [19] pensent que le principal effet de l'eutypiose étant la mort des coursons. Pour Bolay et Moller [28] le « Dead arm disease » n'est que l'eutypiose. Selon Moller et Kasimatis [37] et Dubos [1], le bras mort a longtemps été attribué au *Phomopsis viticola*, agent de l'excoriose, à cause de la ressemblance des caractères morphologiques et culturels. Aussi, les spores bêta de *Phomopsis viticola* ont une forme similaire à celle des stylospores de *Libertella blepharis*, forme asexuée d'*Eutypa lata*.

8.2.2 Evaluation de l'esca



AOC : Alger, Ouled-Fayet, Cardinal

AAC : Alger, Ain-Benien, Cardinal

MBC : Médéa, Benchicao, Cinsault

MAC : Mascara, Ain-Faress, Cinsault

AAA : Alger, Ain-Benien, Alphonse-Lavallé

THD : Tipaza, Hamr-El-Ain, Dattier de Beyrouth

MBB : Médéa, Benchicao, Dattier de Beyrouth

MMC : Mascara, Mamounia, Carignan

Figure 48 : pourcentage des ceps présentant des symptômes de l'esca au niveau des parcelles (%).

Dans la totalité des vignobles prospectés, il a été noté la présence de symptômes typiques de l'esca avec des taux variables. Ainsi, le plus élevé, 23% a été enregistré dans la localité de Hamr-El-Ain (Tipaza) sur le Dattier de Beyrouth, alors qu'il est de l'ordre de 4% dans la localité de Mamounia (Mascara) sur la variété Carignan (figure48).

Les observations ont révélé l'existence des deux formes, lente et foudroyante de l'esca. A l'exception de la localité de Mamounia où la forme lente n'a pas été observée. Signalons que les ceps exprimant la forme lente sont plus importants que ceux qui montrent la forme foudroyante (21% pour la forme lente et seulement 4,6% pour l'apoplexie). Ces taux peuvent paraître assez importants, comparés à certaines parcelles en Turquie, où le taux n'excède pas 0,53% avec 1,43% de ceps manifestant la forme lente et 0,18% la forme foudroyante [65]. Ces taux restent moyens comparés à des parcelles d'Ugni blanc en France, où la forme lente a atteint 51% et la forme foudroyante 9,7% [49].

8.2.3. Evaluation des dépérissements au niveau des cépages

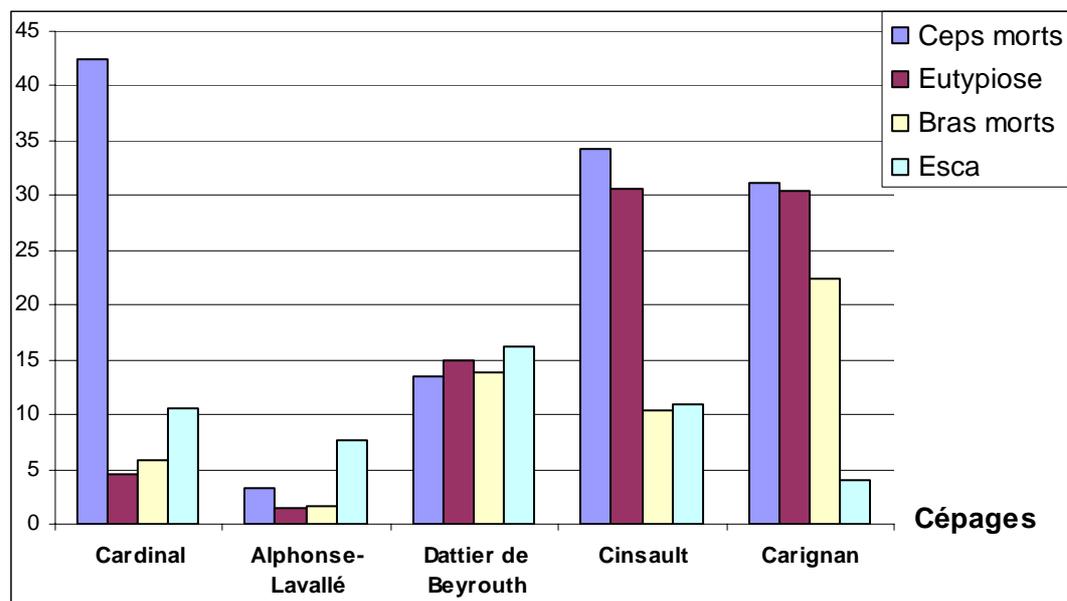


Figure 49 : taux de mortalité, de l'eutypiose, de bras mort, et de l'esca par cépage (%)

Les différents symptômes de dépérissement ont été observés sur les cinq cépages étudiés, avec des taux variables (figure 49).

Alphonse-Lavallée est le cépage qui se trouve dans une situation sanitaire la plus correcte comparé aux autres cépages étudiés. Seulement 3,2% de mortalité, 1,6% de ceps avec un bras mort, 1,4% de ceps eutypiés et 7,6% d'esca. Des observations de symptômes d'esca en Turquie, ont montré qu'ils sont beaucoup plus discrets chez la variété Alphonse-Lavallée que chez la variété Cardinal [79].

Le Dattier de Beyrouth est moyennement touché par le dépérissement. Les taux de mortalité, d'eutypiose, de bras morts et de l'esca se rapprochent sensiblement allant de 13,4% à 16,2%. Néanmoins, les résultats montrent que l'expression la plus marquée des symptômes de l'esca se trouve chez cette variété avec un taux de 16,2%.

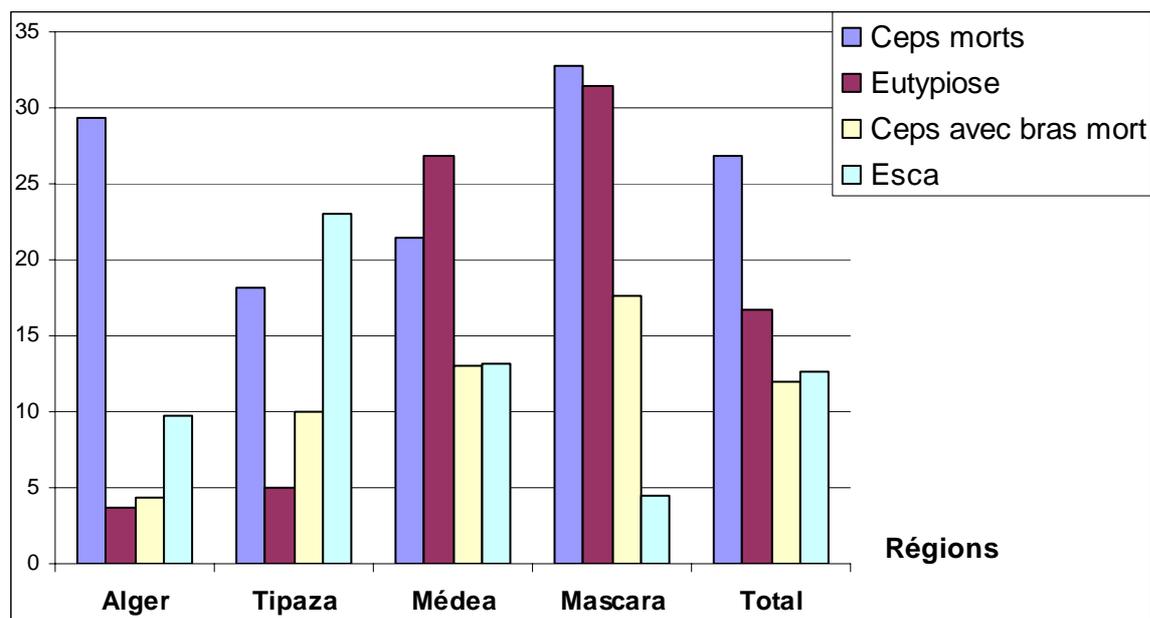
Le Cardinal est de loin le cépage le plus touché par la mortalité, mais ne montre les symptômes de l'eutypiose que dans 4,5% des cas. Cette mortalité pourrait avoir une autre cause de dépérissement que l'eutypiose, contrairement au Cinsault où le taux de mortalité et celui des ceps eutypiés sont aussi importants et se rapprochant (34,3% et 30,6%). Ainsi, la

gravité des symptômes de l'eutypiose que nous avons constaté, correspond bien à la place de ce cépage dans l'échelle de sensibilité proposée par Dubos [24] et Péros [44].

Quant au Carignan, les résultats montrent l'importance et la similitude entre le niveau d'expression des symptômes de l'eutypiose, de bras morts et de la mortalité. Par contre, très peu de ceps (4%) avec des symptômes d'esca sont observés. Dans ce cas de figure, l'eutypiose semble être une des causes importantes de cette mortalité, ainsi que la présence de bras morts. Bien que le Carignan soit classé par Dubos [24] comme étant tolérant à l'eutypiose.

Il est évident que le classement des cépages n'a pas une valeur absolue. Selon Dubos [1], il indique plutôt une tendance. D'après Péros [44], un cépage tolérant est un cépage qui exprime une tolérance dans certaines conditions, mais il peut montrer un niveau très élevé de maladie à la suite de stress répétés ou de conditions particulières. Selon ce même auteur, la différence de sensibilité suggère l'existence d'interactions complexes entre le cépage, la localité, les conditions de culture et la pression de l'inoculum.

8.2.4. Evaluation des dépérissements au niveau des régions



* : exprime la moyenne des pourcentages enregistrés dans les quatre régions

Figure 50 : pourcentage des ceps morts, atteints de l'eutypiose, de bras mort et de l'esca par région (%).

La mortalité des ceps est assez importante dans les quatre régions prospectées allant de 18,2% à 32,8%. Le taux le plus élevé a été enregistré dans la région de Mascara qui se trouve également la plus affectée par l'eutypiose avec un taux de 31,4%. Contrairement à la région d'Alger où la maladie s'est manifestée avec un moindre degré de gravité, soit 3,7% des ceps atteints (figure 50).

La présence des bras morts au niveau des ceps est également la plus marquée dans la région de Mascara où nous avons compté 17,6% de ceps atteints et seulement 4,4% au niveau de la région d'Alger.

La région de Tipaza est la plus affectée par les attaques de l'esca. Les symptômes apparaissent à une fréquence de 23%.

L'ensemble des symptômes de dépérissement (eutypiose, esca et bras mort) ce sont manifestés au niveau des vignobles de la région de Médéa, avec des taux assez importants comparés aux autres régions prospectées.

En analysant ces données, nous avons constaté (à l'exception de la région de Médéa) l'existence d'une relation entre la manifestation des différents symptômes de dépérissement. Dans une parcelle, plus le nombre de ceps qui manifestent les symptômes de l'eutypiose et de bras morts est important, moins il est pour l'esca.

En ce qui concerne les facteurs explicatifs de l'expression des différents symptômes de dépérissement, il ressort que :

- Il n'y a pas de relation avec l'âge des vignes (Tableau 3), ainsi les jeunes vignobles présentent les symptômes de l'esca (Alger et Tipaza) et les plus âgés ceux de l'eutypiose (Mascara et Médéa). Bien que la littérature présente l'esca comme étant une maladie des vignes âgées [93, 27, 4, 54]. D'après Carter et Moller [50]; Pedzoldt *et al.*, [36], l'eutypiose se manifeste sur des vignes beaucoup plus jeunes chez qui, la sensibilité diminue avec l'augmentation de l'âge. Contrairement à Mimiague et Le Gall [46] qui pensent que l'âge constitue l'un des principaux facteurs favorisant la maladie. Car il traduit la durée d'exposition des ceps aux risques de contaminations. D'après cette hypothèse, les vieux ceps sont vraisemblablement plus atteints que les jeunes.

- Les conditions climatiques des différentes régions étudiées (Annexe 3), influencent certainement l'expression des symptômes de l'esca et de l'eutypiose.

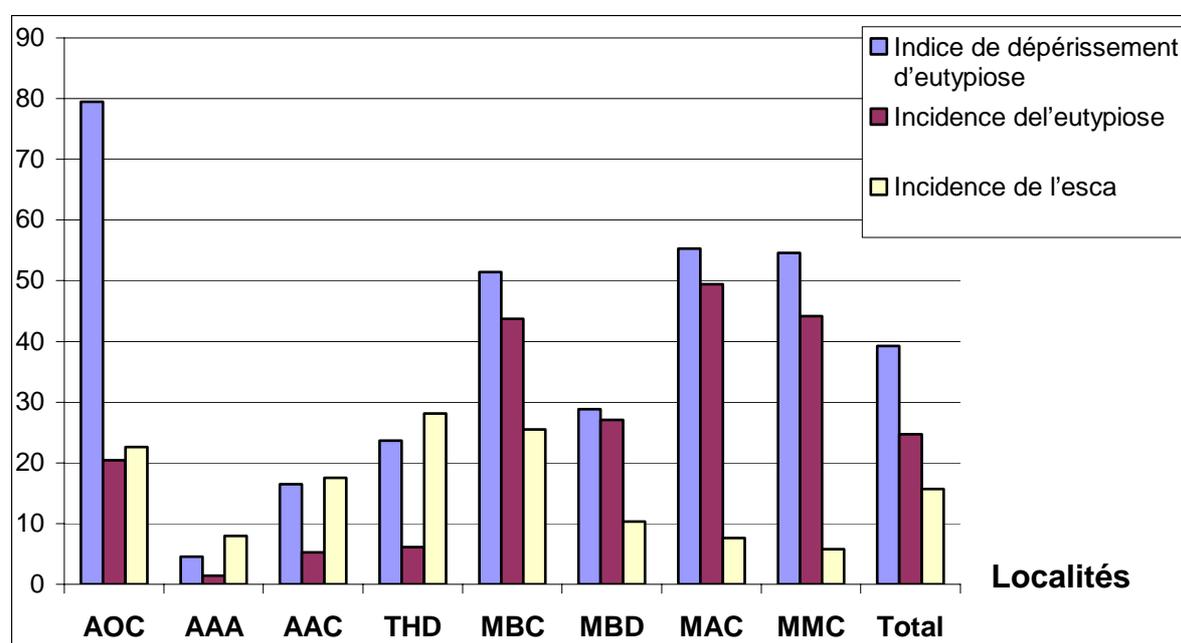
La présence de l'esca dans la région d'Alger et Tipaza peut s'expliquer par des différences météorologiques rencontrées durant cette dernière décennie (1993- 2003). En effet, les températures moyennes mensuelles et les précipitations enregistrées durant l'été (Annexe 3) sont plus importantes que celles relevées à la station de Mascara et Médéa. Ces conditions pourraient favoriser la manifestation des symptômes de l'esca. Selon Dubos [1] ils sont nettement visibles en été et en automne et favorisée par un temps chaud surtout lorsqu'une pluie est suivie d'une période de sécheresse. Ce qui pourrait s'expliquer par l'augmentation de la concentration en toxines lorsqu'il n'y a pas une compensation de l'évaporation [54].

La région de Médéa, située approximativement à 1200 m est caractérisée par une chute de neige plus importante que les autres régions (Annexe 3). Ce qui peut également, influencer l'évolution de l'eutypiose. Cette constatation est confirmée par Paillassa *et al.*, [33] qui mentionnent que la neige crée des conditions d'humectation des bois porteurs de périthèces

susceptibles de libérer des ascospores. Cette émission est particulièrement importante en intensité (4 à 10 fois supérieure à une émission normale) et en durée (1 à 3 jours de plus).

Le problème des gelées est particulièrement important dans la région de Mascara (Annexe 3). En effet, Galet [7] et Dubos [1] notent que les gelées hivernales provoquent l'éclatement des ceps. Ce qui favorisent l'installation d'*Eutypa lata*.

8.2.5 Incidence de l'eutypiose, de l'esca et indice de dépérissement de l'eutypiose



AOC : Alger, Ouled-Fayet, Cardinal

AAC : Alger, Ain-Benien, Cardinal

MBC : Médéa, Benchicao, Cinsault

MAC : Mascara, Ain-Faress, Cinsault

AAA : Alger, Ain-Benien, Alphonse-Lavallé

THD : Tipaza, Hamr-El-Ain, Dattier de Beyrouth

MBD : Médéa, Benchicao, Dattier de Beyrouth

MMC : Mascara, Mamounia, Carignan

* : exprime la moyenne des incidences et de l'indice de dépérissement au niveau des parcelles

Figure 51 : Incidence de l'eutypiose, de l'esca et indice de dépérissement de l'eutypiose dans les différentes parcelles (%).

D'une manière générale, pour les quatre régions confondues, nous constatons que l'incidence de l'eutypiose est plus importante que celle de l'esca. Mais elles diffèrent d'une parcelle à une autre. En effet, à l'exception de la parcelle d'Ouled-Fayet (Alger) et celle du Cinsault à Benchicao (Médéa), où les deux incidences sont aussi importantes, il ressort que plus l'incidence de l'eutypiose est importante, moins elle est pour l'esca. Ainsi, pour les deux

localités de Mascara, l'incidence de l'eutypiose a atteint 49,5 %, alors qu'elle n'est que de 5,8 % pour l'esca. A l'inverse de la parcelle de Hamr-El-Ain (Tipaza), où l'incidence de l'esca a atteint 28,1% contre seulement 6,1% pour l'eutypiose.

L'incidence de l'eutypiose varie de 1,4% à 49,4%. Une situation similaire a été signalée en Australie, où certaines parcelles ont montré des incidences qui varient de 1,6% à 46,2% [102]. En revanche, elle reste assez élevée comparée à l'incidence déterminée dans 21 parcelles en France, où elle varie de 0,3% à 39,4% [44].

Quant à l'esca, l'incidence est comprise entre 5,8% et 28,1%. La situation paraît moins grave comparée à d'autres parcelles. Surico *et al.*, [83] ont évalué l'incidence de l'esca dans quatre parcelles où elle était comprise entre 9,93% et 49,09%. Dans une étude réalisée en Italie sur 19 parcelles, l'incidence varie de 8,7 à 43,4% [76]. Aussi, Cortesi *et al.*, [103] ont signalé que dans certaines régions méditerranéennes, plus de 50% des vignobles ont une incidence qui varie de 20 à 30%.

Néanmoins, ces résultats ne nous permettent pas de se faire une idée précise de l'ampleur de ces maladies. Car selon Péros [44], le fait de ne pouvoir mesurer l'incidence qu'à partir de la présence des symptômes foliaires, provoque une sous estimation de l'incidence réelle. Aussi, dans une même parcelle, l'incidence annuelle est toujours inférieure à l'incidence cumulée sur plusieurs années d'observations. Donc il faut suivre sur une plus longue période le devenir des ceps ayant montré des symptômes.

Les indices de dépérissement des huit parcelles prospectées, varient de 4,6% à 79,5%. Ils sont nettement supérieurs aux incidences enregistrées. Donc l'eutypiose n'est pas la seule cause du dépérissement. D'après Péros [44], les variations de l'indice de dépérissement s'expliquent par des différences importantes au niveau des ceps morts ou absents. Ceux-ci sont beaucoup plus nombreux dans la parcelle d'Ouled-fayet (Alger). Ce qui explique l'importance de l'indice de dépérissement (79,5%) par rapport à l'incidence (20,2%).

CHAPITRE 9

CARACTERISATION ET IDENTIFICATION DES AGENTS FONGIQUES

9.1. Différents aspects du bois nécrosé

L'analyse des 80ceps en voie de dépérissement (présentant des symptômes de l'eutypiose, de l'esca, ou des bras morts) (Tableau 12) prélevés afin de réaliser les isollements, a révélé l'existence de huit nécroses principales dans les troncs et les bras.

Tableau 12 : Nombre de ceps, selon la parcelle de prélèvement, présentant les symptômes de dépérissement.

Parcelles	Symptômes		
	Eutypiose	Esca	Bras mort
AOC : Alger, Ouled-Fayet, Cardinal	2	8	0
AAA : Alger, Ain-Benien, Alphonse-Lavallé	2	6	2
AAC : Alger, Ain-Benien, Cardinal	2	5	3
THD : Tipaza, Hamr-El-Ain, Dattier de B.	4	0	6
MBC : Médéa, Benchicao, Cinsault	3	0	7
MBD : Médéa, Benchicao, Dattier de Beyrouth	3	3	4
MAC : Mascara, Ain-Faress, Cinsault	1	5	4
MMC : Mascara, Mamounia, Carignan	3	2	5
Total	20	29	31

- **Nécrose A** : Nécrose brune et dure en position centrale, elle est composée d'une zone brune à consistance dure, entourée par le bois sain qui est parfois parsemé de ponctuations de couleur noire (Figure 30).

- **Nécrose B** : Nécrose brune et molle en position centrale, elle est composée d'une zone brune et molle entourée d'une zone brune à noire à consistance dure et le bois sain (Figure 31).



Figure 30 : Nécrose brune et dure en position centrale



Figure 31 : Nécrose brune et molle en position centrale .

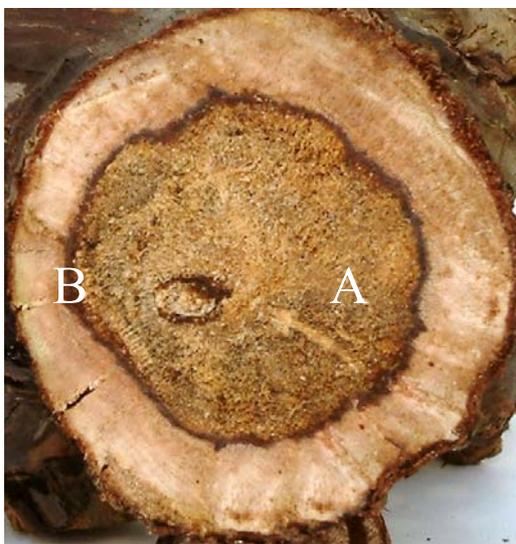


Figure 32 : Nécrose centrale de couleur claire (A) bordée par un liseré (B)

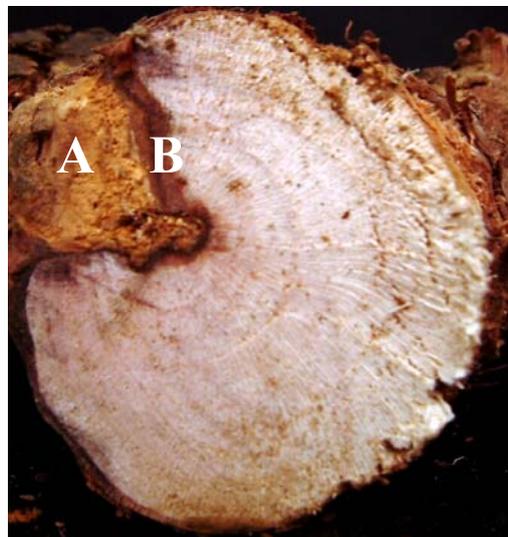


Figure 33 : Nécrose claire et tendre (A) délimité par un liseré (B) en position sectorielle



Figure 34 : Nécrose brune et dure en position sectorielle caractéristique de l'eutypiose.



Figure 35 : Association des nécroses brunes et dures en position centrale et sectorielle

- **Nécrose C** : Nécrose claire et tendre en position centrale, elle est composée de trois zones. En position centrale, le bois est de consistance tendre, de couleur claire et friable. Cette zone cariée est délimitée par un fin liseré de couleur brun foncée à consistance dure et du bois sain présentant des ponctuations (Figure 32).

- **Nécrose D** : Nécrose claire et tendre en position sectorielle, composée de deux zones : une zone claire à consistance tendre semblable à l'amadou, entourée par le bois sain (Figure 33).

- **Nécrose E** : Nécrose brune et dure en position sectorielle, elle se caractérise par la couleur brun foncé et sa consistance dure. Elle est caractéristique de l'eutypiose (Figure 34).

- **Nécrose F** : Association des nécroses brunes et dures en position centrale et sectorielle (Figure 35).

- **Nécrose G** : Association des nécroses claires et tendres en position centrale et Sectorielle (Figure 36).

- **Nécrose PN** : ponctuations de couleur noire au niveau du bois sain (Figure 37).
Ces ponctuations sont retrouvées à la périphérie de la plupart des nécroses des plantes analysées.

La description des différentes nécroses rencontrés dans les troncs et les bras des ceps analysés est comparable à celle décrite par de nombreux phytopathologistes [4, 91, 5].



Figure 36 : Association des nécroses claires et tendres en position centrale et sectorielle



Figure 37 : Ponctuations noires (PN) au niveau du bois sain

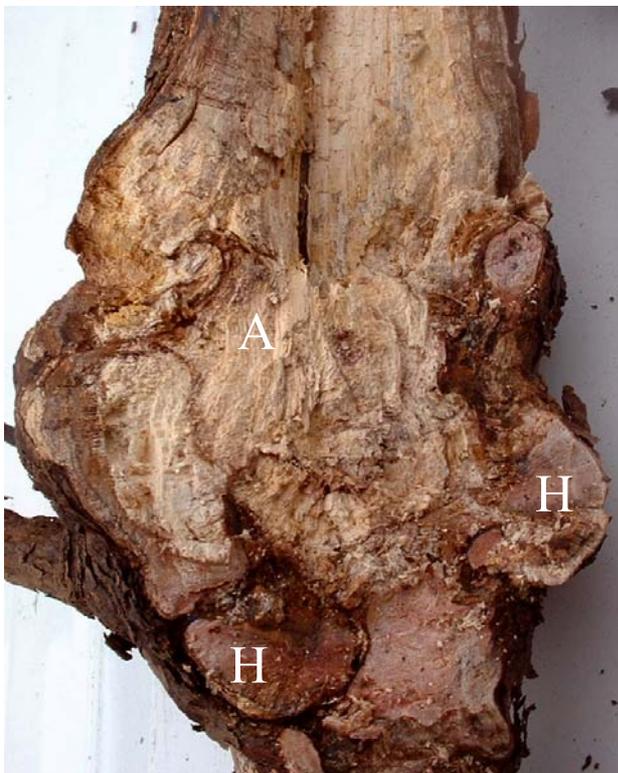


Figure 38 : Coupe longitudinale dans un tronc
nécrose clair et tendre (A)
nécrose brune et dure (H)



Figure 39 : Coupes transversales dans un tronc
montrant la succession des nécroses

9.2. Aspect des nécroses en relation avec les symptômes des parties herbacées

Tableau 13 : pourcentage de ceps examinés selon les symptômes en relation avec les nécroses (%).

Types de nécroses	Eutypiose	Esca	Bras mort	Total
Nécrose A	2,5	8,75	7,5	18,75
Nécrose B	2,5	6,2	1,25	9,95
Nécrose C	6,2	11,2	5	22,4
Nécrose D	2,5	6,2	7,5	16,2
Nécrose E	7,5	7,5	12,5	27,5
Nécrose F	3,7	3,7	8,7	16,1
Nécrose G	2,5	3,7	2,5	8,7
Nécrose PN	6,25	32,5	28,7	67,45

Nombre de ceps analysé : 80ceps.

Différentes nécroses ont été observées au niveau des ceps analysés. Les plus fréquentes sont :

La nécrose brune et dure en position sectorielle (E) avec 27,5% et la nécrose claire et tendre en position centrale (C) avec 22,5%. Les ponctuations (la nécrose PN) sont rencontrées dans 67,45% des ceps observés.

Quant à la relation des symptômes externes des ceps examinés avec les différentes nécroses retrouvées dans le bois, nous constatons que toutes les nécroses sont présentes au sein des ceps qui montrent les symptômes d'eutypiose, d'esca et de bras mort.

Chez les ceps qui manifestent les symptômes, au niveau de la partie herbacée caractéristique de l'eutypiose, la nécrose la plus rencontrée est la nécrose brune et dure en position sectorielle (E).

Les ceps qui manifestent des symptômes d'esca, présentent le plus souvent une nécrose claire et tendre en position centrale (C).

Chez les ceps qui présentent un bras mort, c'est plutôt la nécrose brune et dure en position sectorielle (E) qui est la plus observée.

En analysant ces résultats, nous constatons que les nécroses essentiellement retrouvées correspondent à celle décrites dans la littérature. Aussi, il existe une relation entre le type de nécrose et les symptômes au niveau des parties herbacées. La nécrose claire et tendre en position centrale correspond à la nécrose caractéristique de l'esca [78, 64, 87, 80] et la nécrose sectorielle est caractéristique de l'eutypiose [28, 25, 5].

Quant à la comparaison des symptômes d'eutypiose, d'esca et de bras mort avec les nécroses du bois, nous constatons la présence de la nécrose brune sectorielle caractéristique de l'eutypiose, au niveau des ceps présentant un bras mort. Ce résultat pourrait bien confirmer l'implication de l'eutypiose dans la mortalité des bras des ceps [37].

9.3. Agents fongiques impliqués dans le dépérissement

Divers agents fongiques ont été isolés à partir des 2090 bûchettes découpées dans les différentes zones des nécroses. L'analyse de cette microflore a montré que six champignons semblent être impliqués dans le dépérissement du fait qu'ils soient fréquemment isolés (Tableau 14). A côté de ces agents fongiques, nous avons isolé à de faibles fréquences d'autres microorganismes. Parmi les genres fongiques les plus rencontrés : *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Verticillium*. Cette microflore a été rapportée comme flore d'accompagnement associée aux isollements réalisés sur les ceps de vigne [78, 81, 64, 95, 92].

Quant au *Stereum hirsutum*, champignon associé à l'esca, il n'a pas été isolé des plantes analysées. Un constat similaire a été rapporté dans l'étude réalisée par Mugnai *et al.*, [54] en Italie où ce champignon n'a pas été retrouvé.

Tableau 14 : Fréquence d'isolement des agents fongiques à partir des 80 ceps

Agents fongiques	Nombre d'isolats	Fréquence d'isolement %*
<i>Eutypa lata</i>	19	25
<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	52	65
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	49	61,2
<i>Fomitiporia punctata</i>	27	35
<i>Phomopsis viticola</i>	26	32,5
<i>Botryosphaeria sp.</i>	46	57,5

* NB : La fréquence d'isolement est supérieure à 100%, du fait qu'à partir d'une seule bûchette, plusieurs agents fongiques sont isolés en même temps.

9.3.1. Caractères morphologiques des isolats cryptogamiques

9.3.1.1. *Eutypa lata*

Observation sur ceps : Sur des ceps morts laissés au sol, en dessous de l'écorce, nous avons constaté la présence de nombreuses fructifications globuleuses, noirâtres, disposées sur une seule couche (Figure 41).

L'observation microscopique des fructifications, nous a permis de distinguer de nombreux asques cylindro-calviformes, arrondis au sommet, munis d'un pédicelle. Chaque asque contient des ascospores arquées, d'un jaune pale mesurant 7-11 μm de long sur 1,5-2 μm de large. Ces asques sont libérés à partir d'un ostiole qui s'ouvre par un pore (Figure 40a). Il s'agit de la forme infectieuse du champignon : les périthèces.

Caractères cultureux : sur milieu PDA, ce champignon présente des colonies régulières d'une couleur blanchâtre, d'un aspect cotonneux. Le mycélium est aérien, il devient très dense en vieillissant. Après un mois de culture, il y'a formation de pycnides (fructifications asexuées : *Libertella blepharis*) noirâtres et globuleuses à la surface de la boîte (Figure 40). Ces fructifications ne se développent pas chez toutes les cultures.

Caractères micro morphologiques : le mycélium est hyalin, cloisonné et ramifié. Une multitude de conidies ou stylospores filiformes, arqués et hyalins (Figure 40b). Ils mesurent 18-25 x 1 μm et sont libérés à partir de l'ostiole des pycnides (Figure 40a).

Figure 40 : Culture d'*Eutypa lata* âgée d'un mois
Présence de pycnides

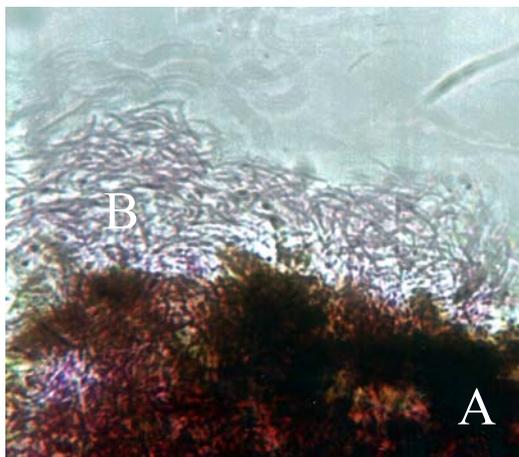


Figure 40a : Pycnide(A) libérant les stylospores(B)
d'*Eutypa lata* (G : 40x10)

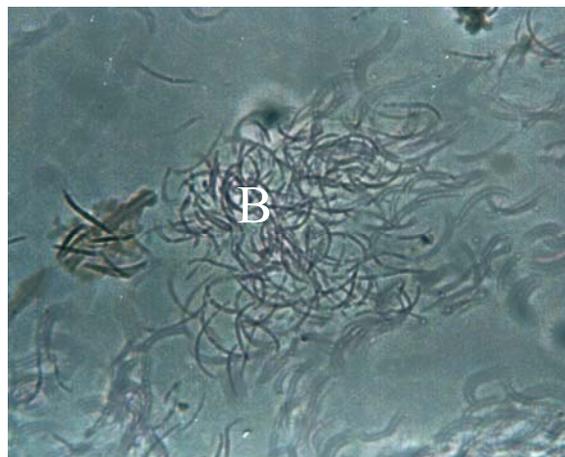


Figure 40b : Stylospores(B) filiformes arquées
d'*Eutypa lata* (G : 40x10)



Figure 41 : Périthèces d'*Eutypa lata* à la surface
du bois mort

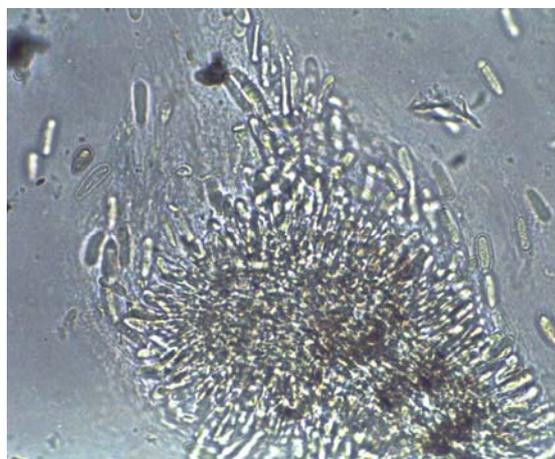


Figure 41a : Libération des ascis et
des ascospores d'*Eutypa lata* (G : 40x10)

9.3.1.2. *Phaeomoniella chlamydospora*

Caractères culturels : sur milieu PDA, la colonie est tout d'abord blanche, puis vert clair pour devenir vert olivâtre à noir olive. Elle est arrondie, régulière et de texture lisse (Figure 42).

Caractères micro morphologiques : le mycélium est ramifié, cloisonné et de couleur brun verdâtre (Figure 42a). Les conidiophores sont simples, courts, épais et de couleur foncée. Les phialides sont plus claires et se terminent par des collerettes tubulaires (Figure 42b). Les conidies sont hyalines, oblongues à ellipsoïdales, regroupées à l'apex du phialide et mesurant 4-4,2 x 1,5-2 μm . Des chlamydospores apparaissent sur des cultures âgées de plus d'un mois. Elles sont abondantes, globuleuses à sub-globuleuses, la plupart du temps elles sont solitaires mais nous les retrouvons aussi, en chaînettes. Elles se caractérisent par leurs parois épaisses de couleur verte olivâtre.

9.3.1.3 *Phaeoacremonium aleophilum*

Caractères culturels : il présente sur milieu PDA, une colonie blanc gris, puis devient beige à miel. La colonie est de forme irrégulière de texture poudreuse. Après une semaine d'incubation, elle diffuse dans le milieu un pigment jaunâtre (Figure 43).

Caractères micro morphologiques : le mycélium est ramifié, cloisonné et de couleur brun clair. Les phialides sont effilées et se terminent par une étroite collerette (Figure 43a). Les conidies sont hyalines et regroupées au sommet de la phialide. Elles sont oblong-ellipsoïdales à allantoïdes elles mesurent 4,5-5 x 1,5-2,5 μm . Les chlamydospores sont absentes.

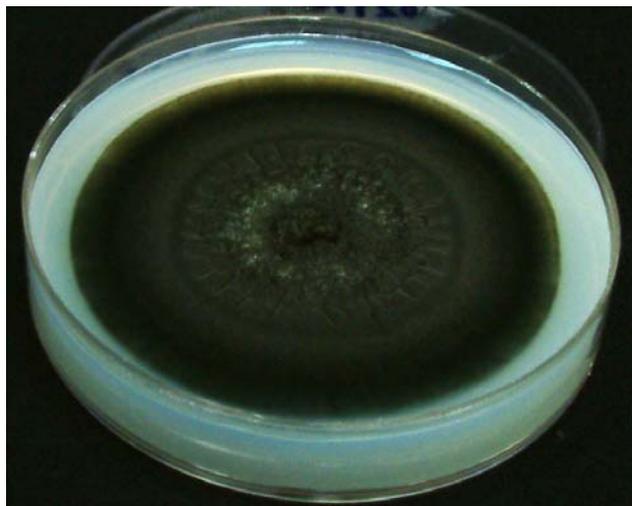


Figure 42 : Culture de *Phaeoconiella chlamydospora* âgée d'un mois sur milieu PDA

Figure 42a : Mycélium cloisonné et ramifié de *P. chlamydospora* (G : 40x10)

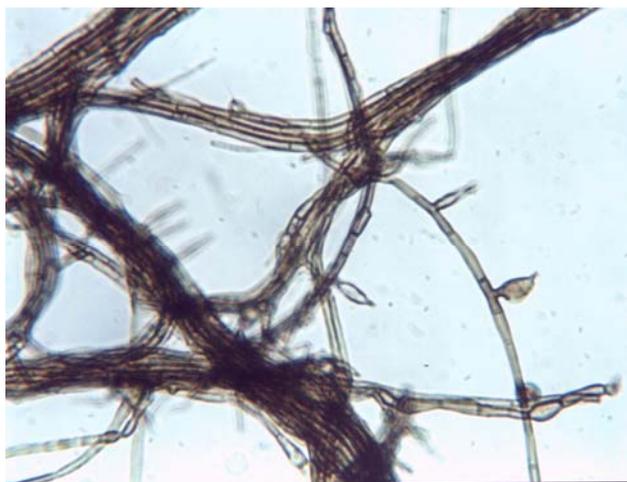


Figure 42b : Conidiophore renflé et pigmenté de *P. chlamydospora* (G : 100x10)

9.3.1.4. *Fomitiporia punctata*

Caractères culturels : le champignon, sur milieu PDA, présente des colonies circulaires qui sont au départ blanches, puis deviennent ocre. Le mycélium est aérien, il présente un aspect velouté et mamelonné (Figure 44).

Caractères micro morphologiques : Le mycélium est fin, de couleur jaune or et dépourvu de cloisons (Figure 44a). Ces observations révèlent l'absence de structures conidiogènes.

9.3.1.5. *Botryosphaeria sp.*

Caractères culturels : la culture de ce champignon sur le milieu PDA, présente des colonies régulières d'un aspect cotonneux. Le mycélium est blanc au départ, puis vire vers le gris clair pour devenir gris très foncé à noir. C'est un mycélium aérien, il devient très dense avec le temps (Figure 45).

Caractères micro morphologiques : le mycélium de ce champignon est coloré d'un brun très foncé à noir. Il est cloisonné et ramifié (Figure 45a). Des chlamydospores apparaissent avec le vieillissement de la culture. Notons l'absence de structures conidiogènes.

9.3.1.6. *Phomopsis viticola*

Caractères culturels : sur milieu PDA, la colonie est irrégulière, elle débute son développement par l'apparition d'un mycélium cotonneux, d'une couleur blanche à crème, avec l'apparition de secteurs teintés d'un brun foncé. Les pycnides se forment rapidement, parsemant la surface de la colonie mycélienne. Elles sont noires de forme globuleuse, le plus souvent groupées et émettent un cirrhe jaunâtre, parfois verdâtre (Figure 46).

Caractères micro morphologiques : ce champignon présente un mycélium hyalin, cloisonné et ramifié. Les pycnides émettent des pycniospores à partir de l'ostiole. Ces pycniospores (Figure 46a) sont de deux types : Les spores alpha sont hyalines et elliptiques. Elles mesurent 6,5-9 x 2-3,5 μm . Les spores bêta sont de couleur blanche, brillante et filiformes mesurant 16-28 x 0,5-1 μm . ces spores ressemblent aux stylospores d'*Eutypa lata* (Figure 46b).

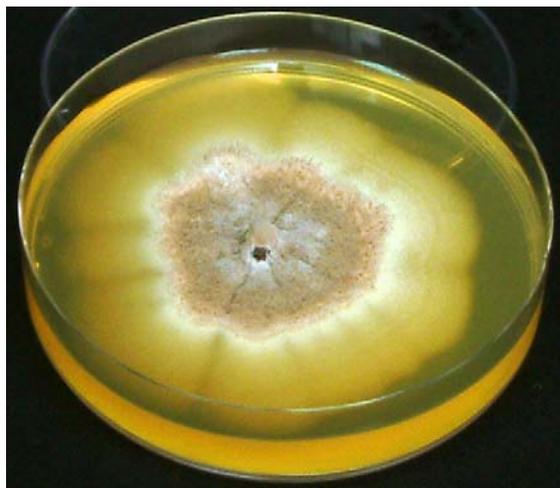


Figure 43 : Culture de *Phaeoacremonium aleophilum*
Diffusion d'un pigment jaune dans le milieu

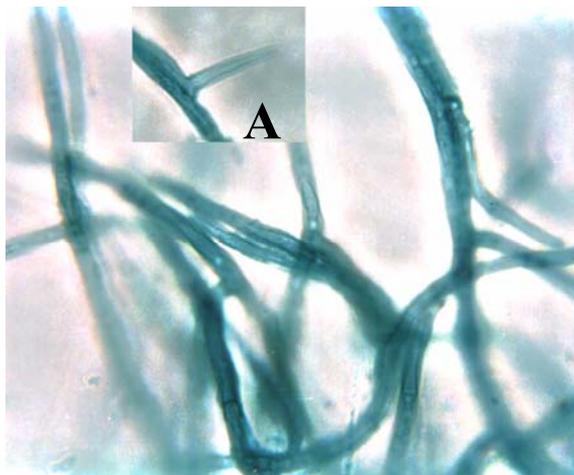


Figure 43 a : Mycélium cloisonné et ramifié
de *P. aleophilum* (A) conidiophore (G : 100x10)



Figure 44 : Culture de *Fomitiporia punctata*
âgée d'un mois

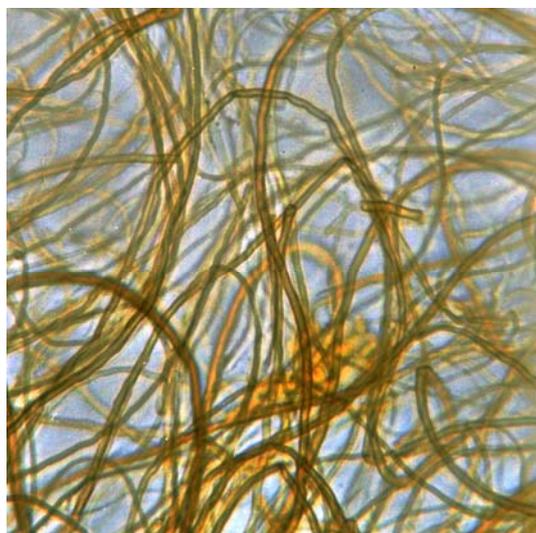


Figure 44a : Mycélium jaune or, dépourvu
de cloisons (*F. punctata*) (G : 40x10)



Figure 45 : Culture de *Botryosphaeria sp.*
Sur milieu PDA, âgée d'un mois

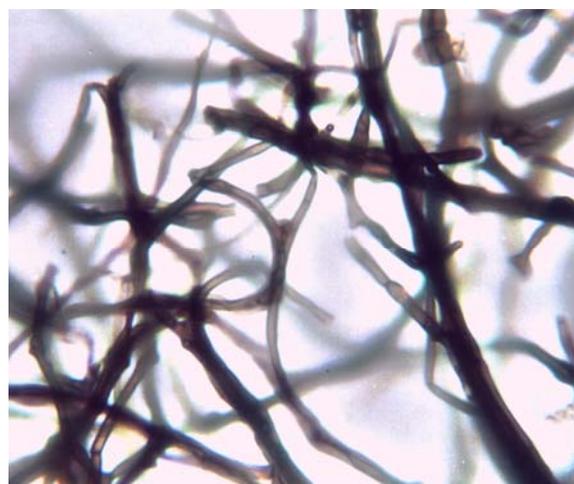


Figure 45a : Mycélium cloisonné et ramifié de
couleur brun foncé de *Botryosphaeria sp* (G : 40x10)

Figure 46: Culture de *Phomopsis viticola* sur milieu PDA, âgée d' un mois

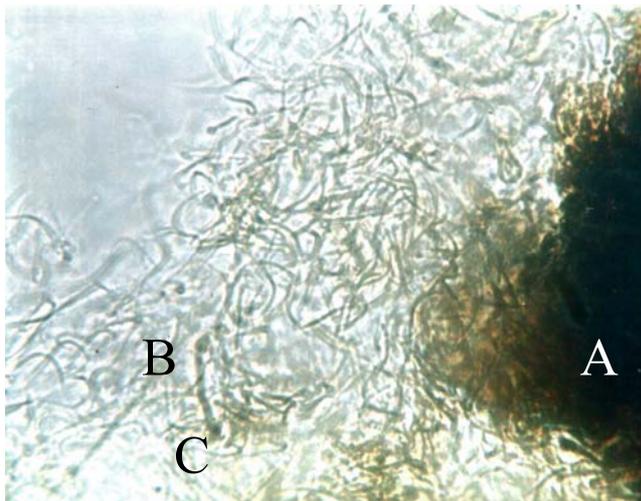
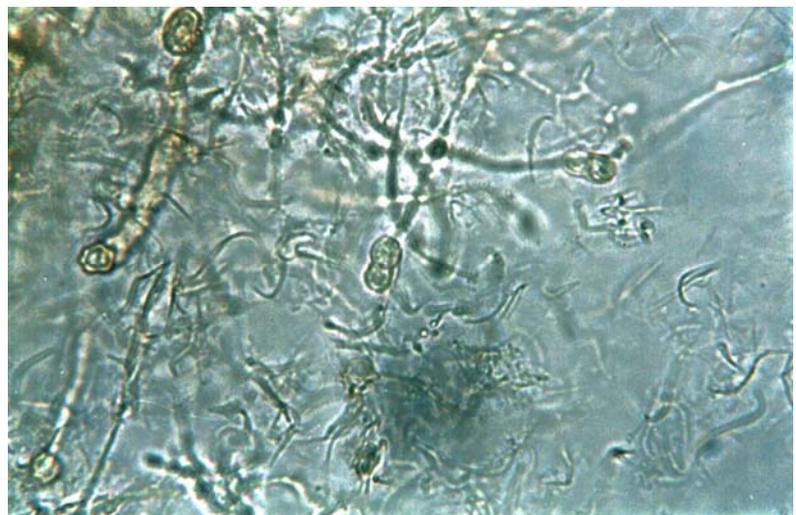


Figure 46a :
Pycnide (A) libérant les conidies (B, C)
de *Phomopsis viticola* (G : 40x10)

Figure 46b : Les deux types de Pycniospores de *P. viticola*
(B) les spores bêta filiformes
(C) les spores alpha, hyalines et elliptiques (G : 40x10)



9.3.2 Identification par PCR

9.3.2.1 Résultats de l'amplification de l'ADN de *Phaeoacremonium aleophilum*

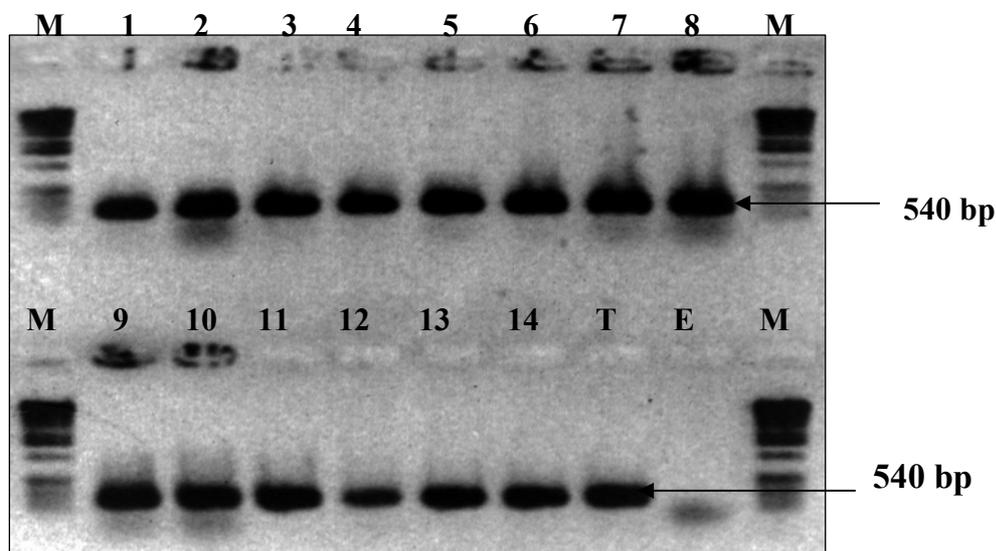


Figure 52 : Résultat de l'amplification de l'ADN de *Phaeoacremonium aleophilum*

- | | |
|----------------------------|----------------------------------|
| 1 : isolat B2a | 9 : isolat S3b |
| 2 : isolat H2a | 10 : isolat A5b |
| 3 : isolat H3a | 11 : isolat K10b (Glucanex) |
| 4 : isolat F7c | 12 : isolat K10b (sans Glucanex) |
| 5 : isolat B4c | 13 : isolat M5a (Glucanex) |
| 6 : isolat K3b | 14 : isolat M5a (sans Glucanex) |
| 7 : isolat F3a | T : témoin <i>P.aleophilum</i> |
| 8 : isolat H5b | E : témoin sans ADN |
| M : Marqueur de taille 1Kb | |

Sur la photographie du gel (figure 52) apparaissent 15 signaux positifs correspondant aux 14 isolats testés et au témoin *Phaeoacremonium aleophilum*. La distance parcourue par les marqueurs des isolats testés et celle parcourue par le témoin est la même.

Nous constatons également, que les deux protocoles utilisés pour l'extraction de l'ADN ont bien fonctionné. Le même signal est obtenu, qu'il s'agisse de l'extraction par choc thermique ou avec le kit Quiagen (avec ou sans Glucanex). Retenons l'efficacité, la rapidité et la simplicité du premier protocole.

La forte concentration en ADN explique l'existence de signaux au niveau des puits.

9.3.2.2 Résultat de l'amplification de l'ADN de *Phaeoconiella chlamydospora*

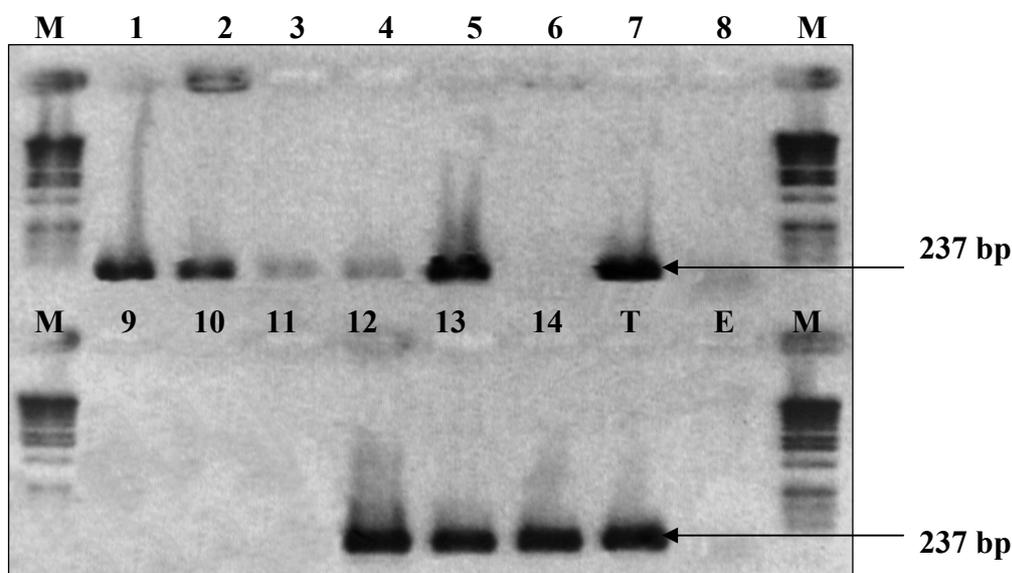


Figure 53 : Résultat de l'amplification de l'ADN de *Phaeoconiella chlamydospora*

- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1 : isolat C2b | 9 : isolat A2a |
| 2 : isolat M4b | 10 : isolat A1b |
| 3 : isolat S7b | 11 : isolat B2a (Glucanex) |
| 4 : isolat K8b | 12 : isolat B2a (sans Glucanex) |
| 5 : isolat K7c | 13 : isolat S5c (Glucanex) |
| 6 : isolat B9a | 14 : isolat S5c (sans Glucanex) |
| 7 : isolat H2b | T : Témoin <i>P.chlamydospora</i> |
| 8 : isolat F9e | E : Témoin sans ADN |
| M : Marqueur de taille 1Kb | |

Sur la photographie du gel (figure 53) apparaissent 8 signaux bien visibles sur les 14 isolats testés correspondant à l'amplification attendue de *P. chlamydospora*.

Un faible signal apparaît pour deux isolats (S7b et K8b) et aucun signal n'apparaît pour les isolats F9e, A2a, A1b et B2a. Ce résultat peut s'expliquer par :

- Une concentration d'ADN insuffisante. La quantité d'ADN peut influencer le résultat de l'amplification.
- Des substances inhibitrices peuvent bloquer l'amplification.
- Un problème d'inhibition lié à la pigmentation du mycélium de *P. chlamydospora*. Les isolats peu mélanisés permettent une meilleure amplification.

9.3.3.3 Résultats de l'amplification de l'ADN d'*Eutypa lata*

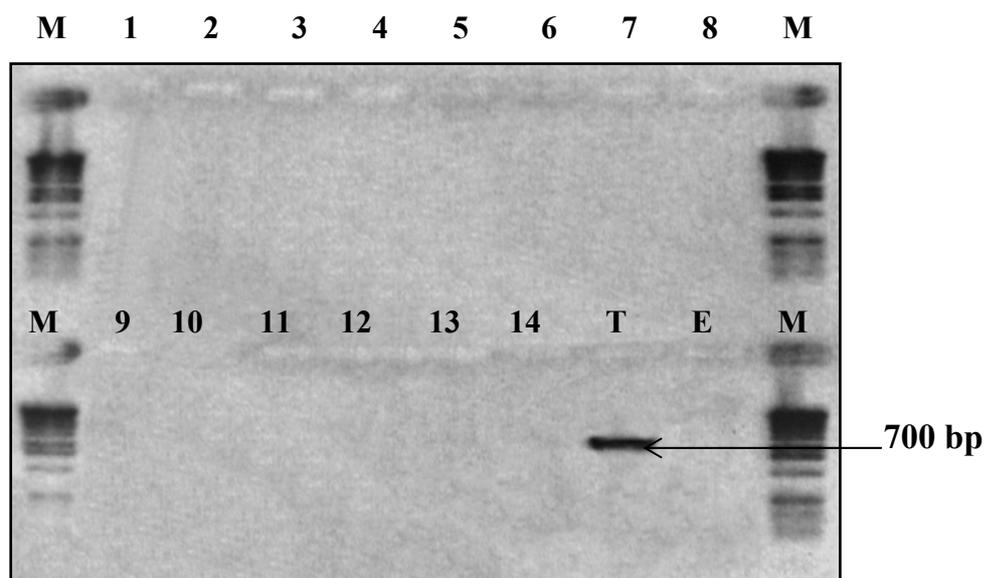


Figure 54 : Résultat de l'amplification de l'ADN d'*Eutypa lata*

- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1 : isolat S1a | 9 : isolat B10a |
| 2 : isolat S2b | 10 : isolat LC 405 |
| 3 : isolat S4a | 11 : isolat H3c (Glucanex) |
| 4 : isolat S5a | 12 : isolat H6c (sans Glucanex) |
| 5 : isolat S6a | 13 : isolat K6a (Glucanex) |
| 6 : isolat B1a | 14 : isolat H1a (sans Glucanex) |
| 7 : isolat B6a | T : Témoin <i>Eutypa lata</i> |
| 8 : isolat B8a | E : Témoin sans ADN |
| M : Marqueur de taille 1Kb | |

Sur la photographie du gel (figure 54) nous apercevons un seul signal positif sur un total de 15 isolats testés. Il correspond au témoin positif (ADN de Bx 1-10). Tous les autres échantillons n'ont donné aucun signal.

Des hypothèses expliquant les résultats négatifs obtenus. Il s'agirait d'une faible concentration d'ADN ne permettant pas l'obtention d'amplification. Aussi, des substances inhibitrices ont pu bloquer l'amplification.

CHAPITRE 10
LOCALISATION DES AGENTS FONGIQUES DANS LES NECROSES ET
LEUR RELATION AVEC LE CEPAGE ET LA REGION

10.1. Localisation des champignons dans les différentes nécroses

Tableau 15 : Fréquence des champignons en relation avec la forme et la couleur des nécroses.

Nécrose	A	B	C	D	E	F	G	PN
Forme	centrale	centrale	centrale	sectorielle	sectorielle	Association des deux	Associat. des deux	Ponctuations
Couleur	brune	brune	claire	claire	brune	brune	claire	brune
<i>E.Lata</i>	0	0	5,6	23,8	22,7	53,8	42,9	0
Pch	40	44,4	50	7,7	22,7	23,08	14,3	63,2
Pal	33,3	33,3	61,1	61,5	40,9	61,5	57,1	19,1
Fop	6,7	11,1	77,8	61,5	13,6	0	57,1	2,9
Ph.v	0	11,1	5,6	30,8	45,4	53,8	71,4	5,9
B	46,7	55,6	33,3	38,5	59,1	30,8	42,9	23,5
Total	100	100	100	100	100	100	100	100

E.Lata : *Eutypa lata*

Pch : *Phaeoconiella chlamydospora*

Pal : *Phaeoacremonium aleophilum*

Fop : *Fomitiporia punctata*

Ph.v : *Phomopsis viticola*

B : *Botryosphaeria sp.*

Les champignons associés à l'eutypiose et à l'esca ont des localisations différentes dans les nécroses :

Eutypa lata est isolé des nécroses dures et tendres en position sectorielle, de l'association des nécroses, sectorielle et centrale. Nous remarquons son absence au niveau des nécroses brunes en position centrale et des ponctuations.

Ce résultat confirme ceux déjà obtenus par Bolay et Moller [28]; Moller et Kasimatis [37]; Dubos [24]; Péros et Berger [21] et Péros *et al.*, [87] qui montrent qu'*E. lata*, agent causal de

l'eutypiose, provoque une nécrose brune sectorielle caractéristique de la maladie. Sa présence au niveau de la nécrose tendre s'explique par le fait que le bois soit colonisé par le champignon de la seconde séquence parasitaire, qui transforme le bois brun en un bois de couleur claire à consistance tendre. Une telle évolution dans la dégradation du bois a été aussi, signalé par Larignon et Dubos [64]. Ils estiment qu'*E. lata* intervient dans les premières étapes de la colonisation du bois, d'où son rôle de pionnier dans le syndrome de l'esca.

Phaeomoniella chlamydospora est particulièrement isolé des ponctuations noires qui sont situées à la périphérie des nécroses. *Phaeoacremonium aleophilum* est isolé à partir de toutes les nécroses, il est rencontré à une fréquence assez importante (61,5%) au niveau de la nécrose claire en position centrale, sectorielle et l'association des deux nécroses brunes. De nombreux auteurs ont montré que ces deux champignons causent des détériorations au niveau du bois, produisant des nécroses brunes. Aussi ils sont présents au niveau des ponctuations qui se trouvent à la périphérie de pratiquement toutes les nécroses et dans le liseré, ce qui traduit le taux élevé d'isolement [78, 91, 66]. Il convient aussi de noter, que ces champignons interviennent dans les toutes premières étapes de la colonisation du bois. D'où leur rôle de pionniers dans la maladie de l'esca [72, 82].

Fomitiporia punctata est isolé plus particulièrement de la nécrose claire en position centrale et sectorielle. Par contre, il est rarement présent dans les nécroses brunes, de l'association des deux nécroses brunes et des ponctuations. Ce résultat montre que *F. punctata* est le champignon responsable de la dégradation du bois en amadou, comme l'ont suggérés de nombreux phytopathologistes [61, 81, 82, 54,103]. Ce champignon intervient dans la dernière étape de la colonisation du bois, même si récemment, Sparapano *et al.*, [39] ont pu démontrer que ce champignon est capable de coloniser le bois seul.

Phomopsis viticola est surtout présent au niveau des nécroses sectorielles de couleur brune et claire et de l'association des nécroses centrale et sectorielle de couleur claire. Alors qu'il est absent de la nécrose brune centrale et rarement isolé des autres nécroses centrales et des ponctuations. Sa présence au niveau des nécroses sectorielles et son absence des nécroses centrales, pourraient confirmer l'hypothèse de Dye et Carter [104] quant à l'implication du *Ph. viticola* avec *E. lata* dans le dépérissement. Selon Larignon [4] et Dubos [1] *Ph. viticola* pourrait être un colonisateur primaire du bois.

Botryosphaeria sp. a été isolé à partir de toutes les nécroses, qu'elles soient sectorielles, centrales, claire ou brune et des punctuations à des fréquences qui varient de 23,5% à 55,6%. Ca présence dans toutes les nécroses s'explique, selon Larignon [4] par sa capacité à se développer dans le bois sain sans avoir un effet appréciable sur celui-ci. Ou encore, par le fait qu'il soient parmi les envahisseurs tardifs de la colonisation du bois. Quant à Ferreira *et al.*, [90] ils suggèrent l'hypothèse d'une colonisation primaire du bois par ces champignons. Pour Castillo-Pando *et al.*, [105] le rôle de *Botriosphaeria sp.* dans le dépérissement n'est pas clair. Egalement, Phillips [106] rapporte que *Botriosphaeria sp.* sont des saprophytes et parmi eux, ceux qui sont pathogènes pour la vigne. Tel est le cas pour le « Black dead arm » maladie récemment découverte en France par Larignon et Dubos [94] causée par des espèces de *Btryosphaeria*.

10.2. Répartition des agents fongiques selon les cépages

Tableau 16 : Fréquence des champignons en relation avec les cépages.

Agents fongiques	Cardinal	Alphonse-lavallée	Dattier deBeyrouth	Cinsault	Carignan
<i>E. lata</i>	1 ^a /20 ^b *	1/10	5/20	10/20	2/10
Pch	15/20	4/10	12/20	15/20	6/10
Pal	15/20	6/10	9/20	13/20	6/10
Fop	12/20	6/10	6/20	3/20	0
Ph.v	5/20	3/10	7/20	3/20	2/10
B	15/20	5/10	10/20	10/20	5/10

E.Lata : *Eutypa lata*

Pch : *Phaeomoniella chlamydospora*

Pal : *Phaeoacremonium aleophilum*

Fop : *Fomitiporia punctata*

Ph.v : *Phomopsis viticola*

B : *Botryosphaeria sp.*

* le rapport représente : (a) nombre de champignons isolés ; (b) nombre de ceps analysés

Les résultats (tableau 15) montrent la microflore isolée à partir de chaque cépage. *Eutypa lata* a été plus particulièrement retrouvés chez le Cinsault, et beaucoup moins chez le Cardinal.

Phaeomoniella chlamydospora et *Phaeoacremonium aleophilum* sont les micro-organismes les plus fréquemment isolés des différents cépages. Nous les retrouvons chez le Cinsault et le Cardinal à une fréquence assez importante.

Fomitiporia punctata a été très souvent isolé du Cardinal et Alphonse-lavallée. Mais il n'est pas du tout retrouvé chez le Carignan.

Phomopsis viticola a été retrouvé chez tous les cépages à des taux pratiquement similaires et d'une moindre importance, comparativement aux autres champignons.

Botryosphaeria sp. est également isolé des cinq cépages. La fréquence d'isolement est de 75% pour le Cardinal et de 50% pour les autres cépages.

Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de différence notable dans le type de champignons isolés. Excepté le Carignan, chez qui *Fomitiporia punctata* n'a pas été retrouvé. Notons aussi, qu'il existe des différences qu'en aux taux d'isolement au niveau de chaque cépage.

L'analyse symptomatologique des parties herbacées suggère la présence d'une relation entre le cep et les champignons retrouvés. Les cépages chez qui nous avons compté le plus d'*E. lata*, sont ceux qui ont exhibé des symptômes d'eutypiose. En revanche, le *F. punctata* a été retrouvé beaucoup plus chez les cépages qui ont manifesté des symptômes d'esca.

10.3. Répartition des agents fongiques selon la localité et la région

Tableau 17 : Fréquence des champignons en relation avec la localité et la région.

Agent fongique	ALGER		TIPAZA	MEDEA	MASCARA	
	O. Fayet	A. Benien	Hamr-elAin	Benchicao	Ain-Faress	Mamounia
E.lata	1 ^a /10 ^b *	1/20	3/10	6/20	6/10	2/10
Pch	8/10	11/20	3/10	17/20	7/10	6/10
Pal	9/10	12/20	4/10	11/20	7/10	6/10
Fop	6/10	12/20	6/10	3/20	0/10	0/10
Ph.v	4/10	4/20	6/10	8/20	2/10	2/10
B	7/10	13/20	6/10	10/20	5/10	5/10

E.Lata : *Eutypa lata*

Pch : *Phaeomoniella chlamyospora*

Pal : *Phaeoacremonium aleophilum*

Fop : *Fomitiporia punctata*

Ph.v : *Phomopsis viticola*

B : *Botryosphaeria sp.*

* le rapport représente : (a) nombre de champignons isolés ; (b) nombre de ceps analysés

La comparaison de la microflore entre les différentes régions viticoles, nous permet de noter quelques différences :

Eutypa lata a été surtout retrouvé dans les échantillons provenant de la région de Mascara, contrairement à la région d'Alger où il a été faiblement isolé.

Phaeomoniella chlamyospora a été très souvent isolé et dans toutes les régions. Sa présence est marquée au niveau de la localité d'Ouled-fayet à Alger et de Benchicao à Médéa, alors qu'elle est beaucoup moins dans la localité de Hamr-El-Ain à Tipaza.

Phaeoacremonium aleophilum est retrouvé pratiquement avec les mêmes proportions que le *Phaeomoniella chlamyospora*, dans les différentes localités, à l'exception de Benchicao où il est beaucoup moins isolé comparativement au *P. chlamyospora*.

Fomitiporia punctata a été plus particulièrement isolé à Alger et Tipaza. Il est important de signaler son absence dans les deux localités de Mascara.

Phomopsis viticola a été isolé à une fréquence de 60% des ceps provenant de la localité de Hamr-El-Ain. Mais il est retrouvé dans toutes les localités à des fréquences plus inférieures.

Botryosphaeria sp. est présent dans les quatre régions et dans les différentes localités à des taux qui varient de 50 à 70%.

En analysant ces résultats, il en ressort que certains champignons seraient plus prépondérants dans certaines régions que d'autre. *Eutypa lata*, agent de l'eutypiose, a été retrouvé beaucoup plus dans la région de Mascara où l'incidence de l'eutypiose est la plus élevée. L'absence de *F. punctata* dans cette région, pourrait s'expliquer par le fait que les vignes n'ont pas été surinfectées par les champignons causant l'esca. *Fomitiporia punctata* a été surtout isolé dans les régions où les ceps ont manifestaient beaucoup plus de symptômes d'esca que d'eutypiose.

CONCLUSION

Les maladies de dépérissements, l'esca et l'eutypiose, en raccourcissant la vie des ceps et en provoquant une augmentation de la production des ceps encore sains d'une parcelle, vont à l'encontre des intérêts de la viticulture [45]. Ces maladies entament de façon sérieuse le patrimoine viticole. Il est donc indispensable d'acquérir les connaissances de base, afin de dégager un ensemble de pratiques à adopter pour éviter le développement de ces maladies.

Le travail présenté dans ce mémoire a permis de se rendre compte de l'importance de l'esca de l'eutypiose et des dépérissements de manière générale, dans les différents vignobles prospectés.

En ce qui concerne l'expression des symptômes sur les parties herbacées, nous notons une grande hétérogénéité de l'attaque. Des symptômes typiques de l'eutypiose se sont manifestés par un rabougrissement de la végétation. Certains ceps présentaient uniquement un bras mort. Un nombre important de ceps complètement dépéris a été également observé. Quant aux symptômes de l'esca, ces derniers se sont manifestés au niveau des différentes parcelles sous la forme lente et foudroyante.

Les enquêtes menées pendant le mois de Mai et Août 2003, dans les huit vignobles situés dans les quatre régions viticoles : Alger, Tipaza, Médéa et Mascara, ont montré des taux de dépérissement assez importants et parfois alarmants.

La mortalité des ceps est assez importante pour toutes les régions prospectées. Elle a atteint 75,2% dans la parcelle d'Ouled-Fayet. Les graves attaques de l'esca (forme lente et foudroyante) ont été enregistrées dans la région d'Alger et de Tipaza. Les taux les plus élevés de symptômes de l'eutypiose et des bras morts sont présents à Mascara et Médéa, où, en revanche, très peu de symptômes d'esca sont mis en évidence. Ainsi, les jeunes vignobles présentent les symptômes de l'esca et les plus âgées ceux de l'eutypiose.

Sur les cinq cépages observés, nous notons une grande hétérogénéité de l'expression des symptômes au niveau des ceps. Alphonse-Lavallée est le cépage qui se trouve le moins affecté par les dépérissements, comparé aux autres cépages étudiés. Pour le Dattier de Beyrouth, les résultats montrent que l'expression la plus marquée des symptômes d'esca se

trouve chez cette variété. La forte mortalité a été observée chez le Cardinal bien qu'il ne présente que peu de symptômes d'eutypiose et d'esca.

Chez le Cinsault et le Carignan, l'eutypiose semble être le facteur déterminant de la mortalité des ceps. Les résultats montrent une certaine importance et similitude entre la mortalité, les symptômes d'eutypiose et la présence de bras morts. Par contre, nous observons peu de ceps avec des symptômes d'esca.

L'incidence de l'eutypiose varie de 1,4% à 49,4% dans les différentes localités. Celle de l'esca est comprise entre 5,8% et 28,1%. Ce qui témoigne de l'importance de l'eutypiose par rapport à l'esca. La plus grande incidence de l'eutypiose a été atteinte dans la région de Mascara, alors qu'elle n'est que de 5,8 % pour l'esca. Inversement à la parcelle de Hamr-El-Ain (Tipaza), où l'incidence de l'esca a atteint 28,1% et seulement 6,1% pour l'eutypiose.

D'une manière générale, la manifestation des symptômes témoigne d'une assez forte présence de l'eutypiose et de l'esca dans les différents vignobles prospectés. Nous pourrions d'ores et déjà, penser que le rôle de ces maladies sur la mortalité des ceps n'est pas négligeable. Néanmoins, cette étude réalisée durant l'année ne nous permet pas de se faire une idée précise de l'ampleur de ces maladies. En effet, un pied atteint une année peut très bien, l'année suivante, paraître sain. L'ampleur de ce phénomène empêche d'apprécier avec rigueur l'incidence de ces maladies. Aussi, l'expression des symptômes pour une parcelle peut être affecté de variations annuelles fort importantes, qui peuvent faire classer alternativement une parcelle comme peu ou très atteinte.

L'analyse des ceps présentant des symptômes de dépérissement a révélé l'existence de huit nécroses dans les troncs et les bras, qui diffèrent selon la forme, la couleur et la consistance.

L'analyse de la microflore rencontrée dans les ceps dépérissants qui proviennent des divers écosystèmes viticoles montre que, en dépit de la diversité et de l'abondance de cette microflore, six champignons sont impliqués dans le dépérissement du fait qu'ils soient fréquemment isolés. Les tests préliminaires d'identification basés sur les observations macro-morphologique et micromorphologique des cultures, ont permis d'identifier ces agents phytopathogènes : *Eutypa lata*, *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium*

aleophilum, *Fomitiporia punctata*, *Phomopsis viticola* et *Botryosphaeria sp.* L'analyse moléculaire par PCR (Polymerase Chain Reaction) spécifique a permis de confirmer l'identité des champignons pionniers de l'esca. A savoir : *Phaeoconiella chlamydospora* et *Phaeoacremonium aleophilum*.

Cette étude réalisée sur l'esca et l'eutypiose ouvre de nombreuses pistes de recherches. Mais plusieurs aspects fondamentaux restent encore à clarifier. L'analyse plus précise de chacun des facteurs susceptibles d'influencer ces maladies (cépage, porte-greffe, mode de conduite, âge ainsi que les conditions climatiques) permettrait de dégager un ensemble de pratiques à adopter pour éviter leur développement. Aussi, l'élaboration d'une lutte rationnelle dirigée contre les champignons pionniers est indispensable pour limiter la progression dans le bois des différents cryptogames responsables de la dégradation des tissus ligneux.

L'intérêt de la prophylaxie est clairement démontré, en l'absence de traitements contre ces maladies. Il est donc, indispensable de détruire les souches atteintes qui hébergent les sources de l'inoculum et restaurer les souches par recape ou regreffage. Aussi, il faut tailler le plus tardivement possible et protéger les plaies de taille. Dans l'immédiat, des opérations de communication doivent être réalisées auprès des viticulteurs, afin de les prévenir du danger que font peser les maladies de dépérissement sur la pérennité de leurs vignobles.

APPENDICE A

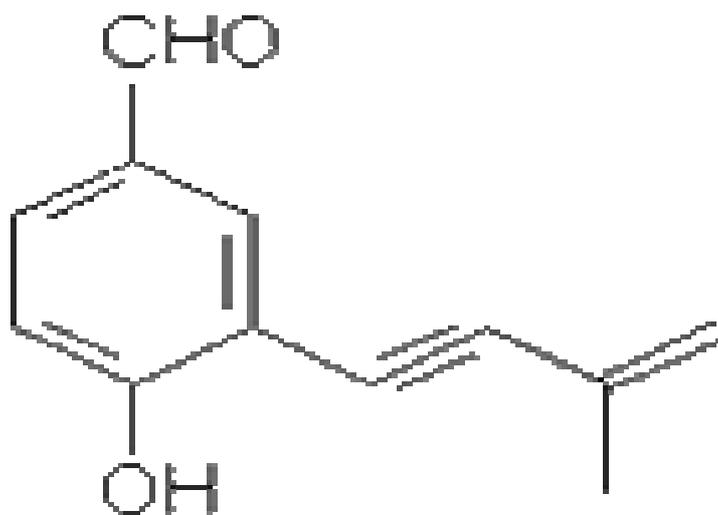
LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide desoxyribonucléique
PDA	: Potato Dextrose Agar
110 R	: 110 Ruggien
140 R	: 140 Richter
41 B	: 41 Berlandier
99 R	: 99 Richter
PCR	: Polymerase Chain Reaction
Pch	: <i>Phaeoconiella chlamydospora</i>
Pal	: <i>Phaeoacremonium aleophilum</i>
Fop	: <i>Fomitiporia punctata</i>
Eut	: <i>Eutypa lata</i>
Phv	: <i>Phomopsis viticola</i>
B	: <i>Botryosphaeria sp.</i>
PN	: Ponctuations noires
AOC	: Alger, Ouled-Fayet, Cardinal
AAA	: Alger, Ain-Benien, Alphonse Lavallée
AAC	: Alger, Ain-Benien, Cardinal
THD	: Tipaza, Hamr-El-Ain, Dattier de Beyrouth
MBC	: Médéa, Benchicao, Cinsault
MBD	: Médéa, Benchicao, Dattier de Beyrouth
MMC	: Mascara, Mamounia, Carignan
MAC	: Mascara, Mamounia, Cinsault
UMR DGPC	: Unité mixte de recherche, diversité et génome des plantes cultivées
Qx	: Quintaux
Km	: kilomètre
Ha	: Hectare
ID	: Indice de dépérissement
mm	: Millimètre
mn	: Minute
°C	: Degré Celsius
ml	: Millilitre
µl	: Microlitre
DNTP	: Désoxy nucleotidyl tri phosphate
TBE	: Tri borate E.D.T.A
V	: Volt
BET	: Bromure d'ethidium
UV	: Ultra violet
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA

APPENDICE B

Annexe 1

Structure chimique de l'eutypine



Hydroxy-4(méthyl-3-butène-3-ynyl-1)-3 benzaldéhyde
(Tabacchi *et al.*, 2000)

Annexe 2

Tableau : superficies et productions viticoles en Algérie
(Source : Ministère de l'Agriculture).

régions	Vignes à vins		Vignes de table		Vignes de raisin de séchage		Superficies totales (ha)
	Sup.totale (ha)	Prod.totale (qx)	Sup.total (ha)	Prod.totale (qx)	Sup.totale (ha)	Prod.totale (qx)	
Alger	0	0	1 462	68 230	0	0	1 468
Tipaza	810	21 640	2 860	185 460	0	0	3 765
Médéa	910	20 370	5 924	161 760	0	0	6 904
Mascara	2 754	9 380	4 007	81 970	60	3 080	7 005
Total Algérie	38 010	458 510	41 860	1 881 390	120	4 070	81 550

Annexe 3

Données climatiques (Période décennale : 1994/2003)
Station Alger (source : office national de météorologie –Dar-El-Beida)

Mois	Température moyenne (°C)	Précipitations (mm)		Phénomènes climatiques (moyenne de jours)		
		Moyenne du mois	Nbre jours moyen	Neige	Gelée	Rosée
Janvier	11,7	91,2	12	0,2	5,5	21
Février	11,5	73,9	10	0,2	6,9	22,9
Mars	13,6	37,2	6	0	4	25,4
Avril	15,2	63,8	8	0	1,5	21,7
Mai	19	31,7	6	0	0	23
Juin	22,8	7,1	1	0	0	26,6
Juillet	25,4	1,7	1	0	0	21,6
Août	26,7	16,3	3	0	0	20,8
Septembre	23,6	31,4	6	0	0	16,7
Octobre	20,2	45,4	8	0	0	23,1
Novembre	15,6	85,2	10	0	0,6	19,7
Décembre	12,7	85,2	12	0	3,3	21,5
Total et moyenne	18,2	570,1	89	0,4	21,8	259

Données climatiques (Période décennale : 1994/2003)
Station Médéa (source : office national de météorologie –Dar-El-Beida)

Mois	Température moyenne (°C)	Précipitations (mm)		Phénomènes climatiques (moyenne de jours)		
		Moyenne du mois	Nbre jours moyen	Neige	Gelée	Rosée
Janvier	6,7	108,8	12	2,4	7,8	3,2
Février	7,7	71,4	9	2,2	5,6	3,8
Mars	10,8	37,7	7	0,3	1,5	4,3
Avril	11,9	67,3	9	0,4	0,9	2,7
Mai	17,4	37,4	6	0,1	0	0,6
Juin	21	5,8	2	0	0	0,2
Juillet	26,3	2,8	2	0	0	0
Août	26,3	9,8	4	0	0	0,9
Septembre	20,7	32,7	6	0	0	2,4
Octobre	14,9	55,8	9	0	0	5,9
Novembre	10,7	91	10	0,1	1,3	5,9
Décembre	7,7	92,8	11	1,5	3,7	4,9
Total et moyenne	15,2	613,1	92	7	20,8	34,7

Données climatiques (Période décennale : 1994/2003)
Station Mascara (source : office national de météorologie –Dar-El-Beida)

Mois	Température moyenne (°C)	Précipitations (mm)		Phénomènes climatiques (moyenne de jours)		
		Moyenne du mois	Nbre jours moyen	Neige	Gelée	Rosée
Janvier	9,2	29,2	9	0,1	9,4	16,8
Février	9,9	33,3	7	0,5	8,8	14,3
Mars	12,7	22,2	5	0	2,1	11,9
Avril	14,2	27,9	7	0	1,2	5,9
Mai	18,7	19,1	4	0	0,1	2,4
Juin	23,8	2,1	1	0	0	0
Juillet	26,7	0,6	0	0	0	0
Août	24,1	8,9	2	0	0	0
Septembre	22,5	18	4	0	0	0,2
Octobre	18,7	31,4	6	0	0	3,4
Novembre	13,2	48,9	8	0	1,5	10,5
Décembre	9,6	38,7	9	0,1	5,2	13,2
Total et moyenne	16,9	277,1	65	0,7	28,3	78,6

Annexe 4

Le questionnaire

Enquête sur les maladies de dépérissement de la vigne

Date :

Parcelle exploitée par :

Localisation de la parcelle :

Cépage :

Superficie :

Année de plantation :

Porte-greffe :

Ecartement entre les rangs :

Ecartement sur le rang :

Mode de conduite :

Date habituelle de la taille :

La parcelle a-t-elle subit un changement du mode de conduite ?

Traitement à l'arsénite de sodium :

Annexe 5

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)

Annexe a : Pomme de terre	200g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

Mode opératoire

Faire bouillir la pomme de terre
 Filtrer et récupérer le jus
 Mettre le glucose et l'agar
 Ajuster jusqu'à 1000 ml avec de l'eau distillée
 Remuer jusqu'à dissolution totale
 Stériliser 20 mn à 120 °C.

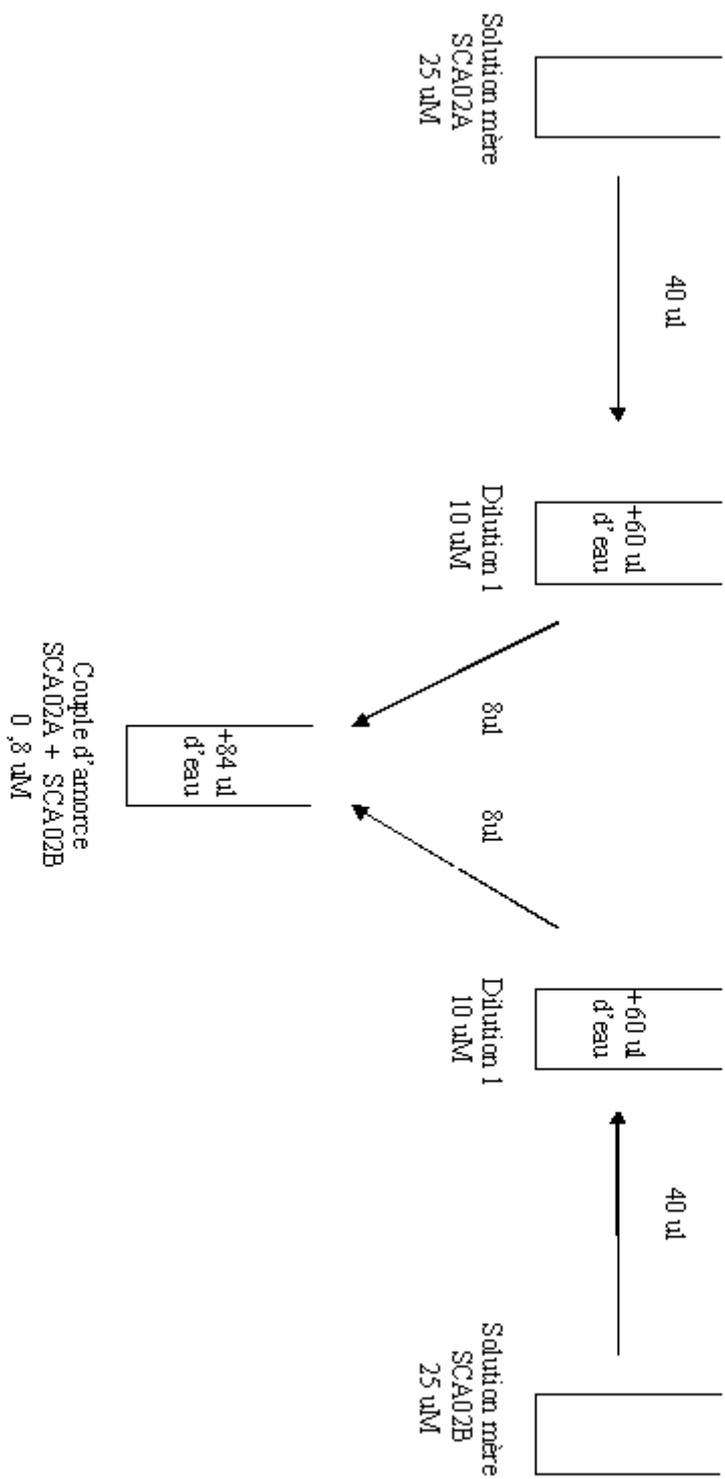
Annexe b : Infusion from potatoes	200g
Bacto dextrose	20g
Bacto agar	15g

Mode opératoire

39 g / litre d'eau distillée
 Remuer jusqu'à dissolution totale
 Stériliser à 121-124°C, pend

Annexe 6**Préparation de la solution de Glucanex**

Quantités pour	10 ml	20 ml	30 ml	40 ml
Glucanex	300 mg	600 mg	900 mg	1,2 g
Na Cl	7 ml	14 ml	21 ml	28 ml
Eau	3 ml	6 ml	9 ml	12 ml
PH= 6,0	corriger avec Na OH (5 m)			



Préparation du couple d'amorces (SCA 02A / SCA02B)

Annexe 7

Annexe 8

Tableau : Nombre de ceps présentant les symptômes d'eutypiose, d'esca, de bras morts et la mortalité par région, localité, cépage, et unité parcellaire.

régions	Localités	Cépages	Unité parcellaire	Mortalité	Eutypiose	Bras mort	Esca lent	Apoplexie
Alger	Ouled-Fayet	Cardinal (AOC)	1	63	8	8	5	2
			2	75	5	3	3	1
			3	66	11	4	7	1
			4	86	1	5	6	1
			5	86	0	6	2	0
	Ain-Benien	Alphonse-Lavallée (AAA)	1	5	3	3	7	7
			2	1	0	0	1	0
			3	6	1	1	4	0
			4	0	0	0	3	0
			5	4	3	4	9	8
	Ain-Benien	Cardinal (AAC)	1	10	3	12	44	0
			2	4	3	4	3	6
			3	9	5	4	2	2
			4	10	9	3	11	1
			5	15	4	10	2	8
Tipaza	Hamr-El-Ain	Dattier de Beyrouth (THD)	1	21	5	14	12	2
			2	20	7	8	24	0
			3	16	6	13	24	1
			4	19	0	10	32	4
			5	15	7	5	13	3
Médéa	Benchicao	Cinsault (MBC)	1	28	46	7	4	2
			2	33	36	5	17	0
			3	38	26	10	24	0
			4	39	19	5	25	1
			5	33	17	14	11	0
	Benchicao	Dattier de Beyrouth (MBD)	1	9	11	18	0	3
			2	3	25	6	9	1
			3	11	23	18	24	0
			4	9	40	19	5	0
			5	11	25	28	4	1
Mascara	Ain-Faress	Cinsault (MAC)	1	49	25	13	1	6
			2	40	31	16	1	5
			3	29	49	11	0	3
			4	31	37	9	0	1
			5	23	20	15	0	8
	Mamounia	Carignan (MMC)	1	17	27	14	0	5
			2	49	37	8	0	3
			3	24	45	18	0	2
			4	33	24	35	0	2
			5	33	19	37	0	8

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Dubos, B.; 2002 : Les maladies cryptogamiques de la vigne. Champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne. Edition Ferret (2eme édition), p200.
2. Galet, P.; 1995 : Précis de pathologie viticole. Imp. JF Impression, Montpellier. p246.
3. Galet, P.; 1977 : les maladies et les parasites de la vigne. Tome 1. Imp. Paysan du Midi, Montpellier. p 871.
4. Larignon, P.; 1991 : Contribution à l'identification et au mode d'action des champignons associés au syndrome de l'esca de la vigne. Thèse de Doctorat, Université de Bordeaux II. (France).
5. Péros, J.P.; Jamaux-Despréaux, I.; Berger, G. and Gerba, D.; 1999 : The potential importance of diversity in *Eutypa lata* and co-colonizing fungi in explaining variation in development of grapevine dieback. Mycological Research, N°103, 1385-1390.
6. Grosclaude, C.; 1993 : Pathologie des blessures mettant à nu le bois chez les végétaux ligneux. Agronomie 13, 441-456
7. Galet, P.; 1999 : Précis de pathologie viticole. 3eme edition. 81-86.
8. Graniti, A. ; Surico, G. and Mugnai, L. ; 2000 : Esca of grapevine : a disease complex or a complex of disaeses?. Phytopath. Medit., 39, 16-20.
9. Carter, M.V.; 1991: The status of *Eutypa lata* as a pathogen. International Mycological Istitute, Phytopathological Paper N°32.
10. Fallot, J.; Deswartes, C.; Dalmayrac, S.; Colrat, S. et Roustan, J.P.; 1997 : L'eutypiose de la vigne : isolement d'une molécule synthétisée par *Eutypa lata* et toxique pour la vigne. C.R Acad. Sci. Paris, Science de la vie, 320, 149-158.
11. Dubos, B.; 1999 : Les maladies cryptogamiques de la vigne. Champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne. Edition Ferret, p175.
12. Samuel, G.; 1933: "Gummosis" or "Dieback" in apricot trees. J. Dep. Agri. South Australia. 36, 979-980.
13. Adam, D. B., 1938: A progress report on a gummosis (dieback) disease in South Australian apricot trees. Journal of the department of agriculture, South Australia, 42, 14-29.
14. Carter. M.V.; 1957: *Eutypa armeniaca* Hansf & Carter sp. An airborne vascular pathogen of *Prunus armeniaca* L. In Southern Australia. Australian Journal of Botany N°5, 21-35.

15. Rappaz, F.; 1984 : Les espèces sanctionnés du genre *Eutypa* (Diatrypacea : Ascomycètes) : étude taxonomique et nomenclature. *Mycotaxon*, 20, 567-586
16. Bolay, A. and Carter, M.V.; 1985: Newly recorded hosts of *Eutypa lata* (*E. Armeniaca*) in Australia. *Plant Protection Quarterly*, 1, 10-20.
17. Dubos, B.; 1994 : Incidences économiques de l'eutypiose dans un vignoble de grand cru de Bordeaux. *Phytoma, La défense des végétaux*, N°467, 15-18
18. Le Gall, D.; Le Gat, Y.; 1994 : Evaluations de la nuisibilité de l'eutypiose au vignoble. *Ann. A.N.P.P.*, 3, 1271-1285.
19. Munkvold, G.P.; Duthie, J.A.; Marois, J.J.; 1994: Reductions in yield and vegetative growth of grapevines due to *Eutypa lata*. *Phytopathology*, N° 84, 186-192.
20. Long, P.G. ; Nicoll, C.L. ; Davis, L.K. and Bradshaw, R.E.; 2003: Producing the sexual stage of *Eutypa lata* in vivo and characterising parents and progeny. 3rd International Workshop on Grapevine Trunk Diseases (ICGTD), New Zealand.
21. Péros, J.P. and Berger, G.; 1994: A rapid method to assess the aggressiveness of *Eutypa lata* isolates and the susceptibility of grapevine cultivars to *Eutypa* dieback. *Agronomie*, 14, 515-523.
22. Péros, J.P.; Berger, G. and Lahogue, F.; 1997: Variation in pathogenicity and genetic structure in the *Eutypa lata* population of a single vineyard. *Phytopath.*, 87, 799-806.
23. Péros, J.P.; Larignon, P.; 1998: Confirmation of random mating and indication for gene flow in the grapevine dieback fungus, *Eutypa lata*. *Vitis*, N°37, 97-98.
24. Dubos, B.; 1987 : Mise au point sur les maladies de dépérissement dans le vignoble Français. *Prog. Agric. Vitic.*, 104, 135-140.
25. Dubos, B.; 1996 : L'eutypiose de la vigne, *Eutypa lata* (Pers. : Fr.)Tul. *C.R. cad. Agric. France*, 82(1), 21-30.
26. Mur, G. et Branas, J.; 1991 : Les maladies du vieux bois. Apoplexie et Eutypiose. *Progrès Agricole et Viticole*, N° 5, 108-114.
27. Bolay, A. ; 1984 : l'eutypiose en arboriculture fruitière. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture*. Vol. 16 (5) : 265-273.
28. Bolay, A. and Moller, W. J.; 1977 : *Eutypa armeniaca* Hansf et Carter, agent d'un grave dépérissement de vignes en production. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture* 9, 241-251.
29. Bolay, A. ; 1986 : Comment protéger la vigne et les arbres fruitiers des attaques d'eutypiose ? *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture* Vol. 18 (1) : 7-13.

30. Belarbi B.; 1983 : Contribution à l'étude de la résistance des vitacées à l'eutypiose (*Eutypa armeniacae* Hansf et Carter) et à l'esca (*Stereum hirsutum* Wild Pirsoon), Thèse, EC. Nat. Sup. Agron. Montpellier, 68.
31. Ju, Y.M. ; Glawe, D.A.; Rogers, J.D.; 1991: Conidial germination in *Eutypa armeniacae* and selected other species of Diatrypaceae: implications for the systematics and biology of Diatrypaceous fungi. Mycotaxon. Vol. 41(1), 311-320.
32. Carter, M.V. and Talbot, P.H.B, 1974: *Eutypa armeniacae*. C.M.I. Description of pathogenic fungi and bacteria N°436.
33. Paillassa, E.; Dubos, B.; Larignon, P. et Chevrier, J.C.; 1992 : L'inoculum infectieux d'*Eutypa lata*. Sa formation, son évolution et sa dispersion : les facteurs qui l'influencent. Phytoma. La défense des végétaux, 440, 184-196.
34. Ramos, D.E.; Moller, W.J.; English, H.; 1975: production and dispersal of ascospores of *Eutypa armeniacae* in California. Phytopathology, 65 (12), 1364-137
35. Chapuis, L.; 1995 : L'eutypiose de la vigne : contribution à l'étude des relations hôte - parasite. Thèse de Doctorat. Université de Bordeaux II (France).
36. Petzoldt, C.H.; Moller, W.J. and Sall, M. A.; 1981: *Eutypa dieback* of grapevine: seasonal differences in infection and duration of susceptibility of pruning wounds. Phytopathology, N°71, 540-453.
37. Moller, W.J. and Kasimatis, A.N.; 1981: Further evidence that *Eutypa armeniacae*-not *Phomopsis viticola*- Incites dead arm symptoms on grape. Plant Disease/ Vol. 65 N°5, 429-431.
38. Renaud, J.M.; 1985 : isolement et identification de métabolites secondaires et phytotoxique d'*Eutypa armeniacae*. Thèse université Neuchatel. Suisse.
39. Sparapano, L.; Bruno, G.; Ciccarone, C. and Graniti, A.; 2000: Infection of grapevines by some fungi associated with esca. I. *Fomitiporia punctata* as wood-rot inducer. Phytopathol. Mediterr. 39, N°1, 46-52.
40. Wiechel, T. J. ; Creaser, M.L. ; Cole, F.M. and Wicks, T.J. ; 2003 : Secondary metabolites produced by southern Australian isolates of *Eutypa lata*. 3rd International Workshop on Grapevine Trunk Diseases (ICGTD), New Zealand.
41. Bernard, A. C. et Mur, G. ; 1986 : Les sites de présence de la souche du mycélium d'*Eutypa lata*, agent causal de l'eutypiose de la vigne. Le Progrès Agricole et Viticole 103, N°11, 288-289.
42. Lardner, R.; Stummer, B. And Scott, E.; 2003: Molecular and biochemical characterisation of *Eutypa lata* in Australia. 3rd International Workshop on Grapevine Trunk Diseases (ICGTD), New Zealand.
43. Tabacchi, R. ; Fkyerat, A. ; Poliart, C. and Dubin, G. M. ; 2000 : Phytotoxins from fungi of esca of grapevine. Phytopath. Médit. N° 39, 156-161.

44. Péros, J.P.; 1995 : Sensibilité des cépages à l'eutypiose: comportement de référence au vignoble. Prog. Agric. Vitic., 112, 61-67.
45. Péros, J.P.; 1999 : Influence du porte-greffe et du cépage sur l'expression des symptômes d'eutypiose. Prog. Agric. Vitic., N°116, 407-414.
46. Mimiague, J. et Le Gall, D.; 1994 : Bilan sur les enquêtes eutypiose dans le vignoble européen. Ann. A.N.P.P., 3, 1263-1270.
47. Boubals, D. et G. Mur, 1990 : Influence du mode de taille de la vigne sur l'attaque du tronc des souches par le champignon *Eutypa lata* cas du Cabernet Sauvignon. Le Progrès Agricole et Viticole 107, 499-501.
48. Ferreira, J.H.S.; 1985: Effect of rootstock on the incidence of dying arm of chenin blanc vines. S. Afr. J. Encol. Vitic., 6, 23-24.
49. Desaché, F.; Courlit, Y. et Ménard, E. ; 1995 : Optimiser la lutte chimique contre l'esca. Phytoma. La défense des végétaux. N°470.
50. Carter, M.V. and Moller, W.J. ; 1977 : Eutypa Canker and Dieback of Apricots. EPPO Bull. 7 (1): 85-94.
51. Carter, M.V.; 1971: Biological control of *Eutypa armeniaca*. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal husbandry, 11, 687-692.
52. Carter, M.V. and Price; 1975: Biological control of *Eutypa armeniaca*. Acomparaison of chemical, biological and integrated control. Australian Journal of Agricultural Research. N°26, 537-543.
53. Ricard, J.L; Grosclaude, C. and Ale-Agha, N.; 1974: Antagonism between *Eutypa armeniaca* and *Gliocladium roseum*. Plant Disease, Report 58, 983-984.
54. Mugnai, L.; Graniti, A. and Surico, G.; 1999: Esca (Black measles) and brown wood-sreaking: two old and elusive diseases of grapevine. Plant Disease/ Vol. 83, 404-418.
55. Mares, H. ; 1865 : Livre de la ferme. Tome 2. 4eme ed., 263.
56. Ravaz, L.; 1898 : sur le folletage. Rev. de Vit., 10, 184-186
57. Ravaz, L.; 1901 : le folletage. Progres agri. et vit., 35, 633.
58. Vinet, E. ; 1909 : L'apoplexie de la vigne en Anjou. Rev. de Vit., N°32, 676-681.
59. Viala, P.; 1926 : recherches sur les maladies de la vigne. Ann. Epiphyt. N°12, 5-108.
60. Arnaud, G. et Arnaud, D.; 1931 : Traité de pathologie végétale, tome I, édition Lechevalier, 428- 444.
61. Chiarappa, L.; 1959: Wood decay of the grapevine and its relationship with black measles disease. Phytopathology, N° 49, 510-519.

62. Hawksworth, D.L. ; Gibson, I.A.S ; Gams, W. ; 1976: *Phialophora parasitica* associated with disease conditions in various trees. Mycol. Soc., 66, 427-431.
63. Dubos, B; Bugaret, Y; Bulit, J et Roudet, J; 1983 : Vigne. Maladies du bois : symptômes et méthodes de lutte. Phytoma- Défense des cultures, 16-19.
64. Larignon, P.; Dubos, B.; 1997 : Fungi associated with esca disease in grapevine. Europ. J. Plant Pathol. N°103, 147-157.
65. Erkan, M.; 2000: A general approach for esca disease in the vineyards of Turkey. Phytopath. Médit., N°39, N°1, 35-37.
66. Gatica, M.; Dubos, B. And Larignon, P.; 2000: The “hoja de malvon” grape disease in Argentina. Phytopath. Médit. 39, 41-45.
68. Crous, P.W.; Gams, W.; Wingfield, M.J.and Wyk, P.S.van.; 1996: *Phaeoacremonium* gen. Nov. associated with wilt and decline disease of woody hosts and human infections. Mycologia, N°88 (5), 786-796.
69. Dupont, J.; Laloui, W.and Roquebert, F. ; 1998 : Partial ribosomal DNA sequences show an important divergence between *Phaeoacremonium* species isolated from *Vitis vinifera*. Mycol. Res. 102 (5), 631-637.
70. Crous, P.W. and Gams, W.; 2000 : *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et com. Nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. Phytopath. Médit. N°39, 112-118.
71. Dupont, J.; Laloui, W.; Larignon, L.; Roquebert, F.; 2000 : *Phaeoacremonium viticola*, a new species associated with Esca disease of grapevine in France. Mycologia, 92(3), 499-504.
72. Ferriera, J.H.S.; Wyk, P.S.van; Venter, E.; 1994: Slow Dieback of Grapevine: Association of *Phialophora parasitica* with Slow Dieback of Grapevine. S. Afr. J. Vitic., Vol. 15, N° 1, 9-11.
73. Morton, L.; 1997: Up date on black goo. Wines & Vines, Vol. 78, N°1, 62-64.
74. Ferriera, J.H.S.; Wyk, P.S.van; Calitz, F.J.; 1999: Slow Dieback of Grapevine in South Africa: Stress-Related Predisposition of Young Vines for Infection by *Phaeoacremonium chlamydosporum*. S. Afr. J. Vitic., Vol. 20, N°2, 43-46.
75. Graniti, A. ; Surico, G. and Mugnai, L. ; 1999 : Considerazioni sul mal dell’esca e sulle venature brune del legno delle vite. Informatore Fitopatologico, 49 (5), 6-12.
76. Marchi, G.; 2001: Susceptibility to esca of various grapevine (*Vitis vinifera*) cultivars grafted on different rootstocks in a vineyard in the province of Siena (Italy). Phytopath. Mediterr., N°40, 27-36.
77. Fischer, M.; 2002: A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). Mycological Progress 1(3): 315-324

78. Mugnai, L.; Surico, G. and Esposito, A.; 1996: Microflora associata al mal dell'esca della vite in Toscana. Inform. Fitopatol. N°46, 49-55.
79. Koklu, G. ; 2000 : Notes on esca disease on some grapevine varieties grown in Turkish thrace. Phytopath. Médit., 39, N°1, 38-40.
80. Stamp, J.; 2001: The contribution of imperfections in nursery stock to the decline of young vines in California. Phytopath. Médit. 40, Supplement, 369-375.
81. Chiarappa, L.; 1997: *Phellinus ignarius*: the cause of spongy wood decay of black measles ("esca") disease of grapevine. Phytopath. Médit., N°36, 109-111.
82. Chiarappa, L.; 2000: Esca (black measles) of grapevine. An overview. Phytopath. Médit., N°39, 11-15.
83. Surico, G.; Marchi, G.; Braccini, P. et Mugnai, L.; 2000 (a): Epydemiology of esca in some vineyards in Tuscany (Italy). Phytopathol. Mediterr. N°39, 190-205.
84. Surico, G.; Marchi, G.; Ferrandino, J.; 2000 (b): Analysis of the spatial spread of esca in some Tuscan vineyards (Italy). Phytopathol. Mediterr. N°39, 211-224.
85. Edward, J.; Marchi, G.; Pasco, I.G.; 2001: Young esca in Australia. Phytopath. Médit. N°40, Supp. 303-310.
86. Sparapano, L.; Bruno, G. and Campanella, A.; 2001 (b): Interactions between three fungi associated with esca of grapevine, and their secondary metabolites. Phytopath. Médit. N°40, Supp. 417-422.
87. Péros, J.P.; Jamaux-Despréaux, I. and Berger, G. ; 2000 :Population genetics of fungi associated with esca disease in French vineyards. Phytopathol. Mediterr. N°39, 150-155.
88. Eskalen, A.; Gubler, W. D.; 2001: Association of spores of *Pheomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium inflatipes*, *Pm. Aleophilum* with grapevine cordons in California. Phytopath. Médit.N° 40, Supp. 429-432.
89. Pasco, I. G.; 1998 : Trunk diseases of grapevine-perspectives from a tour of California. Australian Grapegrower Winemaker, 417, 68-71.
90. Ferreira, J.H.S.; Matthee, F.N.; Thomas, A.C.; 1989: Fungi Associated With Dieback and Pruning Wounds of Grapevines in South Africa. S. Afr. J. Vitic., N°2, 62-66.
91. Jamaux-Despréaux, I.; Berger, G. and Péros, J.P.; 1997: Characterization of microflora putatively involved in esca syndrome on grapevine. 10th congress of the Mediteranean Phytopathological union. June 1-5, Montpellier (France).
92. Pasco, I. G. and Cottral, E.; 2000: Development of grapevine trunk diseases research in Australia. Phytopath. Médit. 39, 68-75.

93. Armengol, J.; Vicent, A.; Torné, L. ; Figueres, F. G.and Jiménez, J. G. ; 2001 : Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain : a three-year survey. *Phytopath. Médit.* 40. supplement, 325-329.
94. Larignon, P. and Dubos, B.; 2000: Preliminary studies on the biology of *Phaeoacremonium*. *Phytopath. Médit.* N°39, 184-189.
95. Bertelli, E ; Mugnai, L and Surico, G ; 1998 : Presence of *Phaeoacremonium chlamydosporum* in apparently healthy rooted grapevine cuttings. *Phytopath. Medit.* N°39, 79-82.
96. Sparapano, L.; Bruno, G. and Graniti, A.; 2001 (a): Three-year observation of grapevines cross-inoculated with esca-associated fungi. *Phytopath. Medit.* N°40, Supp. 376-386.
97. Di Marco, S. ; Mazzullo, A. ; Calzarano, F. and Cesari, A.; 2000 : The control of esca : status and perspectives. *Phytopath. Médit.* N°39, 232-240.
98. Rumbos, I.; Rumbou, A.; 2001: Fungi associated with esca and young grapevine decline in Greece. *Phytopath. Médit.*N° 40, Supp., 330-335.
99. Desaché, F.; Maserolles, G.; Lurton, L. et Cantagrel, R. ; 1992 : Connaissance de l'eutypiose et moyens de lutte : observations sur l'influence du porte-greffe et sur le recepage. *Revue des Œnologues*, N°62, p.8.
100. Calzarano, F. ; Di Marco, S. and Cesari, A.; 2003: Activity of sanitary measures associated with chemical treatments on esca-affected vines with different types of necrosis. 3rd International Workshop on Grapevine Trunk Diseases (ICGTD), New Zealand.
101. Lecomte, P. ; Péros, J. P. ; Blancard, D. ; Bastien, N. and Délye, CH. ; 2000 : PCR Assays That Identify the Grapevine Dieback Fungus *Eutypa lata*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, N°10, 4475-4480.
102. Hight, A.; Wicks, T. ; 1998 : The incidence of *Eutypa* dieback in south Australian vineyards. *The Australian Grapegrower & Winemaker*, 135-136.
103. Cortesi, P.; Fischer, M. and Milgroom, M.G.; 2000: Identification and spread of *Fomitiporia punctata* associated with wood decay of grapevine showing symptoms of esca. *Phytopathology* N° 90, 967-972.
104. Dye, M.H.; Carter, M.V.; 1976: Association of *Eutypa armeniacae* and *Phomopsis viticola* with a dieback disease of grapevines in New Zeland. *Australian Plant Pathology.*, 5(1), 6-7.
105. Castillo-Pando, M. ; Somers, A.; Green, C.D.; Priest, M.and Sriskanthades, M.; 2001: Fungi associated with dieback of Semillon grapevines in the Huter Valley of New South Wales. *Australian Plant Pathology*, 30, 59-63.
106. Phillips, A.J.L. ; 2002 : *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevine in Portugal. *Phytopathol. Mediterr.* N° 41, 3-18