

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

Faculté des Sciences de la nature et de la vie

Département de biotechnologie

MEMOIRE DE MAGISTER

En Sciences Agronomiques

Spécialité : Biodiversité et Bioprotection

**CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE ET MOLECULAIRE DES
BOTRYOSPHAERIACEAE ASSOCIEES AU DEPERISSEMENT DU
CHENE (*QUERCUS* SP.) DANS DIFFERENTES REGIONS DE
L'ALGERIE**

Par

CHOUIH Sofiane

Devant le jury composé de :

BENRIMA Atika	Professeur	U. Blida 1	Présidente
AMRANI Said	MCA	USTHB Babezzouar	Examineur
CHAOUCH Fatma Zohra	MCA	U. Blida 1	Examinatrice
BERRAF Akila	MCA	U. Blida1	Promotrice
AMMAD Faiza	MCB	U. Blida1	Invitée

Blida, Juin 2016

RESUME

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence, les différents agents fongiques pathogènes de la famille des *Botryosphaeriaceae* impliqués dans le dépérissement du chêne en Algérie. A cet effet, nous avons mené nos expérimentations dans quatre parcs nationaux à savoir le parc national d'El Kala, le parc national de Belezma (Batna), le parc national de Chréa (Blida) et le parc national de Tlemcen.

En étudiant 67 arbres présentant les symptômes typiques de dépérissement, nous avons pu remarquer six types de nécroses ; les nécroses brunes en position sectorielle étaient les plus dominantes par rapport aux autres avec un taux de 33%. Plusieurs agents fongiques ont été isolés à partir de ces différentes nécroses, un total de 200 isolats a pu être obtenu, une analyse préliminaire nous a permis de constater l'existence des *Botryosphaeriaceae*, *Biscogniauxia* et *Cytospora* avec des fréquences d'isolement de 56%, 24% et 20% respectivement.

Les caractérisations morphologique et moléculaire des isolats appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae* nous ont permis d'identifier trois espèces faisant partie de trois genre différents ; *Diplodia corticola* (la plus isolée avec une fréquence de 64,51%), *Botryosphaeria dothidea* (19,35%) et *Dothiorella iberica* (16,13%), ces trois espèces ont été identifiées sur la base des séquences ITS sauf pour le genre *Diplodia* où nous avons rajouté l'amplification du EF ; un test de pathogénicité a été effectué à la fin de notre travail en inoculant des branches de chêne vert et de chêne liège avec des isolats de *D. corticola* et *B. dothidea*, ce test a montré que ces deux espèces sont pathogènes avec une virulence beaucoup plus marquée chez *D. corticola* et que *Quercus ilex* est plus résistant à ces agents fongiques de *Quercus suber* ; les postulats de Koch ont été aussi confirmés.

Mots clés : *Botryosphaeriaceae*, *Quercus ilex*, *Quercus suber*, dépérissement, phylogénie.

ABSTRACT

The aim of this work is to highlight the different fungal pathogens of the *Botryosphaeriaceae* involved in oak decline in Algeria. To this end, we conducted our experiments in four national parks: El Kala (El Taref), Belezma (Batna), Chr ea (Blida) and Tlemcen.

By studying 67 trees showing typical symptoms of decline, we noticed six types of necrosis; brown necrosis in sectorial position were the most dominant over other with a rate of 33%. Several fungal agents were isolated from these necrosis, a total of 200 isolates could be obtained, a preliminary analysis has allowed us to establish the existence of *Botryosphaeriaceae*, *Biscogniauxia* and *Cytospora* with 56% of isolation frequencies 24% and 20% respectively.

The morphological and molecular characterization of isolates belonging to the family of *Botryosphaeriaceae* allowed us to identify three species belonging to three different kind; *Diplodia corticola* (the most isolated with a frequency of 64.51%), *Botryosphaeria dothidea* (19.35%) and *Dothiorella iberica* (16.13%), these three species have been identified on the basis of ITS sequences except for the genus *Diplodia* we have added amplification of EF; a pathogenicity test was done at the end of our work by inoculating branches of holm oak and cork oak with isolates of *B. dothidea* and *D. corticola*, this test showed that the two species are pathogenic and that *D. corticola* was the most virulent, and also that *Quercus ilex* is more resistant to such fungal agents than *Quercus suber*; Koch's postulates have been also confirmed.

Keywords: *Botryosphaeraceae*, *Quercus ilex*, *Quercus suber*, dieback, phylogeny.

الملخص

الهدف من هذا العمل هو تسليط الضوء على مسببات الأمراض الفطرية من عائلة *Botryosphaeriaceae* المشاركة في هلاك أشجار البلوط في الجزائر. تحقيقا لهذه الغاية، أجرينا تجاربنا في أربع حدائق وطنية: الحديقة الوطنية للقالمة. الحديقة الوطنية لبلزمة (باتنة). الحديقة الوطنية للشريعة (البيدة)، والحديقة الوطنية لتلمسان.

من خلال دراسة 67 شجرة تظهر عليهم اعراض الانخفاض، لاحظنا ستة أنواع من النخر. كان انخر البني الجزئي الأكثر وجودا مقارنة بالبعض الآخر وذلك بنسبة 33%. تم عزل عدة عوامل فطرية من هذه النخور، و قد سمح لنا التحليل الأولي بإثبات وجود ما يلي: *Botryosphaeriaceae* ، *Biscogniauxia* و *Cytospora* مع 56% ، 24% و 20% من نسب العزل على التوالي.

سمح التوصيف المورفولوجي والجزئي للعزلات التي تنتمي إلى عائلة *Botryosphaeriaceae* بالتعرف على ثلاثة أصناف تنتمي إلى ثلاثة أنواع مختلفة: *Diplodia corticola* (أكثر عزلا مع تردد 64.51%)، *Botryosphaeria dothidea* (19.35%) و *Dothiorella iberica* (16.13%). وقد تم تحديد هذه الأنواع الثلاثة على أساس تسلسل ITS باستثناء نوع *Diplodia* أين أضفنا تسلسل EF. وقد تم اختبار الأمراض في نهاية عملنا، بحقن فروع البلوط الأخضر البلوط الفليني مع عزلات *B. dothidea* و *D. corticola*، أظهر هذا الاختبار أن هذين النوعين هما المسببين للأمراض و كانت *D. corticola* الأكثر ضراوة، وأيضا أن البلوط الأخضر هو الأكثر قدرة على مقاومة هذه العوامل الفطرية من البلوط الفليني. وقد تم أيضا تأكيد فرضيات Koch.

كلمات المفاتيح: *Botryosphaeraceae* ، *Quercus ilex* ، *Quercus suber* الموت الرجعي ، النسالة.

REMERCIEMENT

Tout d'abord, je remercie notre grand **DIEU** de m'avoir donné la santé, les moyens, la volonté, le courage et la chance de faire ces études et de les terminer.

Ma grande reconnaissance s'adresse à ma promotrice D^r BERRAF A. pour la proposition de ce thème, pour son encadrement, ses conseils et ses orientations ainsi qu'à Pr Alan Phillips de m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son laboratoire, mais aussi pour son accueil chaleureux et toutes ses orientations et son aide tout au long de mon séjour à Lisbonne et de m'avoir fait profiter de leurs connaissances

Je remercie profondément Professeur Benrima Atika d'avoir accepté de nous honorer par sa présidence de jury.

Je remercie aussi Docteur Amrani Said, Docteur Chaouch Fatima zahra ainsi que Docteur Ammad Faiza de nous avoir honoré d'accepter de siéger parmi les membres de jury de ce mémoire.

J'adresse mes profonds remerciements à l'équipe du laboratoire de microbiologie de l'université NOVA de Lisbonne notamment Marco, qui m'a appris toutes les manipulations ainsi que Claudia, Marco, Raquel, Oliver et Marcia sans oublier le chef de département Pr José Paulo. Je tiens vraiment à leur exprimer ma gratitude pour leurs précieux conseils, leur encouragement et leur aide.

Mes sincères remerciements vont aux directeurs des parcs nationaux de CHREA, EL-KALA, BELEZMA et TELEMEN et tout leur personnel. Pour leur disponibilité tout au long de mes sorties sur terrain.

Je souhaite remercier Samia du laboratoire de microbiologie pour sa disponibilité et son aide. Ainsi que Wafaa et Sihem du laboratoire de production animal au sein de l'institut des sciences vétérinaires.

Mes plus grands remerciements vont spécialement aux personnes les plus chères au monde, à mes parents, ma femme Ania, mes frères Ahmed et Abdelghani, mes sœurs Sihem et Amina, à Karim et Amel. Ainsi que mes amis Mohamed et Sid Ali, mon cousin Hamza qui m'ont soutenu jusqu'à la dernière minute.

Finalement, je remercie toute personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

DÉDICACES

Je dédie ce mémoire à mes parents,

Vous avez fait plus que vous puissiez faire pour que vos enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et beaucoup de bonheur. Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous m'avez consentis pour mon éducation et ma formation.

À ma femme Ania

Quand je t'ai connu, j'ai trouvé la femme de ma vie, mon âme sœur et la lumière de mon chemin. Sans ton aide, tes conseils et tes encouragements ce travail n'aurait vu le jour. Que dieu nous réunisse pour un chemin commun, long et serein et que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.

À mes frères et sœurs : Amina, Kmimed, Sihem et Shanou,

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Vous avez toujours été présents pour les bons conseils. Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours au long de ma vie professionnelle et personnelle. Veuillez trouver dans ce modeste travail ma reconnaissance pour tous vos efforts, sans oublier ma belle-sœur Amel, mes beaux-frères Karim et Mohamed et tous leurs enfants.

À mes chers amis : Mohamed, Sid ali et Kamza

En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Distribution du chêne-liège dans son aire géographique méditerranéenne et atlantique [13]	19
Figure 1.2	Aire naturelle de répartition du chêne liège en Algérie [16]	20
Figure 1.3	Caractéristiques botaniques et reproductrices du chêne liège [22]	22
Figure 1.4	Aire de répartition méditerranéenne du chêne vert [29]	26
Figure 1.5	Répartition du chêne vert en Algérie [34]	26
Figure 1.6	Aperçu de l'ensemble du chêne vert (<i>Quercus Ilex</i>) A. Chêne vert sur pieds, B. Fleurs (chatons), B. Fruits (gland), D. écorce [39]	28
Figure 2.1	Schéma général des dégradations des arbres forestiers [49]	31
Figure 2.2	Illustration explicative de classes de défoliation du chêne [55]	31
Figure 2.3	Dépérissement du chêne liège résulte de multiples interactions [8]	33
Figure 3.1	Les principaux symptômes de dépérissement sur <i>Quercus</i> causés par <i>des Botryosphaeriaceae</i> : [67] ; [80] (a) le dépérissement des branches, chlorose des feuilles ; (b) mort subite d'arbres matures; (c) flétrissement des nouvelles pousses; (d) un chancre dans le tronc; (e) étendue de la lésion nécrotique; (f) section d'un chancre de branche	38
Figure 4.1	Situation géographique des régions d'étude [99] ; [100] ; [101] ; [102]	43
Figure 4.2	Situation géographique des quatre stations d'étude au PNEK [99] A. Ezana B. Haddada C. Ain El Hout D. Kser Fatima	44
Figure 4.3	Situation géographique des trois stations au sein du PNC [100] A. Ayoun B. Gheley C. Forêt noire	46
Figure 4.4	Localisation de la station d'étude au sein du Parc de Belezma [101]	47

Figure 4.5	Localisation des stations d'étude au PNT [102]	48
Figure 4.6	Deux pieds de chêne liège présentant des symptômes de dépérissement	49
Figure 4.7	Coupes transversale et horizontale d'une branche montrant la nécrose (Personnel, 2014)	50
Figure 4.8	Les différentes étapes d'isolement des champignons a. isolement b. repiquage c. colonie pure d. Conservation	51
Figure 4.9	schéma des étapes de la caractérisation moléculaire	54
Figure 4.10	Induction de la sporulation sur les brindilles de peuplier.	64
Figure 4.11	L'inoculation du bois.	65
Figure 5.1	Symptômes de dépérissement chez le chêne vert.	66
Figure 5.2	Symptômes de dépérissement chez le chêne liège.	67
Figure 5.3	Coupes horizontales montrant les différents types de nécroses.	69
Figure 5.4	Taux des types de nécroses rencontrés dans les quatre stations.	70
Figure 5.5	Taux de répartition des types de nécroses à El Kala	71
Figure 5.6	Taux de répartition des types de nécroses à Tlemcen.	71
Figure 5.7	Taux de répartition des types de nécroses à Batna.	72
Figure 5.8	Taux de répartition des types de nécroses à Blida	72
Figure 5.9	Attribution des types de nécroses selon les plantes hôtes	73
Figure 5.10	Répartition géographiques des agents fongiques isolés dans les quatre régions.	75
Figure 5.11	Quelques produits d'amplification de la région ITS des <i>Botryosphaeriaceae</i> . B : Témoin	75
Figure 5.12	Quelques produits d'amplification du gène EF-1 α de <i>Botryosphaeriaceae</i> . B : Témoin	76
Figure 5.13	Un des 27 arbres phylogénétiques obtenus par maximum de parcimonie à partir des séquences ITS (227 pas, CI= 0,749, RI= 0,946, HI= 0,251). Les valeurs sur les lignes sont les valeurs de Bootstrap avec un rééchantillonnage de 1000 fois. <i>Lasiodiplodia theobromae</i> a été utilisées comme outgroup	79

Figure 5.14	Un des 4 arbres phylogénétiques obtenus par maximum de parcimonie à partir de l'alignement combiné des séquences ITS et TEF(488 pas, CI= 0,732, RI= 0,937, HI= 0,268). Les valeurs sur les lignes sont les valeurs Bootstrap avec un rééchantillonnage de 1000 fois. <i>Lasiodiplodia theobromae</i> a été utilisées comme outgroup	80
Figure 5.15	Un des 210 arbres phylogénétiques obtenus par maximum de parcimonie à partir de l'alignement combiné des séquences ITS et TEF(210 pas, CI= 0,762, RI= 0,956, HI= 0,238). Les valeurs sur les lignes sont les valeurs Bootstrap avec un rééchantillonnage de 1000 fois. <i>Neofusicoccum parvum</i> a été utilisées comme outgroup	82
Figure 5.16	Fréquences d'isolement de <i>D. corticola</i> , <i>B. dothidea</i> et <i>Do. Iberica</i>	83
Figure 5.17	Répartition géographique de <i>D. corticola</i> , <i>Dot. Iberica</i> et <i>B. dothidea</i>	84
Figure 5.18	<i>Diplodia corticola</i> , a. culture agée de 15 jours sur milieu PDA, b. stromas sur brindilles de peuplier, c. libération d'une masse de conidies à partir d'une pycnide, d. conidies	85
Figure 5.19	<i>B. dothidea</i> , a. culture âgée de 15 jours sur milieu PDA, b. stromas sur brindilles de peuplier, c. conidies, d. germination conidienne e. conidiophores	86
Figure 5.20	colonies de <i>Dothiorella iberica</i> âgées de 15 jours sur milieu PDA	87
Figure 5.21	Exemple de lésions sur branche de chêne.	88
Tableau 1.1	La surface couverte par le chêne liège dans le bassin méditerranéen [12]	18
Tableau 1.2	Superficie des subéraies en Algérie [16]	20
Tableau 1.3	Production mondiale du liège [20]	21
Tableau 1.4	Répartition du chêne vert (<i>Quercus Ilex</i>) dans quelques pays du bassin méditerranéen [24]	25
Tableau 4.1	Quelques caractéristiques des stations d'études au PNEK	45
Tableau 4.2	Quelques caractéristiques des stations d'études au PNC	46
Tableau 4.3	Quelques caractéristiques des stations d'études au PNB	47
Tableau 4.4	Quelques caractéristiques des stations d'études au PNT	49

Tableau 4.5	critère d'identification des différents genres	52
Tableau 4.6	Les différentes amorces utilisées	56
Tableau 4.7	Composition du mix de l'amplification [112]	56
Tableau 4.8	Les conditions d'amplification des ITS [156]	57
Tableau 4.9	Les conditions d'amplification du gène d'élongation [112]	57
Tableau 4.10	numéro d'accession à Genbank et données des espèces de <i>Botryosphaeriaceae</i> utilisées pour la reconstruction des arbres phylogénétiques	60
Tableau 5.1	Nombre d'isolat et fréquence d'isolement des agents fongiques isolés.	74
Tableau 5.2	Données relatives aux espèces isolées dans cette étude	77
Tableau 5.3	Fréquences d'isolement des <i>Botryosphaeriaceae</i>	83
Tableau 5.4	Dimensions des nécroses causées par <i>D. corticola</i> et <i>B. Dothieda</i> chez le chêne liège et le chêne vert	88

TABLE DE MATIERE

RESUME

ABSTRACT

ملخص

REMERCIEMENTS

DEDICACE

TABLE DE MATIERE

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION	15
CHAPITRE 1 : PRESENTATION DU CHENE	17
1.1 Chêne liège	17
1.1.1 Taxonomie	17
1.1.2. Aire de répartition	18
1.1.2.1 Aire de répartition mondiale	18
1.1.2.2 Aire de répartition en Algérie	19
1.1.3 Importance économique	21
1.1.4 Caractérisation botanique	22
1.1.5 Importance écologique	23
1.1.6 Caractérisation écologique	24
1.2 Chêne vert	24
1.2.1 Taxonomie	24
1.2.2 Aire de répartition	25
1.2.2.1 Aire de répartition mondiale	25
1.2.2.2 Aire de répartition en Algérie	26
1.2.3 Importance économique	27
1.2.4 Caractérisation botanique	27
1.2.5 Exigences écologiques	28

CHAPITRE 2 : DEPERISSEMENT DU CHENE	30
2.1 Généralités sur le dépérissement	30
2.1.1 Définition du dépérissement	30
2.1.2 Facteurs du dépérissement	30
2.1.3 Les symptômes du dépérissement	31
2.1.4 Les types de dépérissement	32
2.2. Dépérissement du chêne en Algérie	32
2.2.1 Facteurs de dépérissement du chêne liège en Algérie	32
2.2.1.1 Les facteurs écologiques	33
2.2.1.2 Les facteurs anthropiques	34
2.2.1.3 Les facteurs phytosanitaires	34
CHAPITRE 3 : GENERALITEES SUR LA FAMILLE DES BOTRYO- SPHAERIACEAE	36
3.1 La famille des <i>Botryosphaeriaceae</i>	36
3.1.1 Définition	36
3.1.2 Distribution des <i>Botryosphaeriaceae</i>	36
3.1.3 Caractéristiques des <i>Botryosphaeriaceae</i>	36
3.1.4 Les symptômes des <i>Botryosphaeriaceae</i>	37
3.1.5 . Les genre des <i>Botryosphaeriaceae</i>	37
3.1.5.1 Généralités sur <i>Diplodia corticola</i>	39
3.1.5.2 Généralités sur <i>Botryosphaeria Dothidea</i>	39
3.1.5.3 Généralités sur <i>Dothiorella iberica</i>	39
3.2 Identification des champignons	40
3.2.1 Introduction	40
3.2.2 Méthodes de reconnaissance des champignons	40
3.2.2.1 La reconnaissance morphologique d'espèce (MSR)	40
3.2.2.2 La reconnaissance biologique d'espèce (BSR)	41
3.2.2.3 La reconnaissance phylogénétique d'espèce (PSR)	41
CHAPITRE 4 : PARTIE EXPERIMENTALE	43
4.1 Présentation des régions et stations d'étude	43
4.1.1 Parc National d'El Kala PNEK	44

4.1.2 Parc National de Chr�ea PNC	45
4.1.3 Parc National de Belezma PNB	47
4.1.4 Parc National de Tlemcen PNT	48
4.2. Méthode d'échantillonnage	49
4.2.1. Sur terrain	49
4.2.2. Au laboratoire	50
4.2.2.1. Désinfection et isolement	50
4.2.2.2 Le suivie	51
4.2.2.3. Purification et conservation des isolats	51
4.2.2.4. Identification des isolats	52
4.2.2.5. Identification moléculaire	53
4.2.2.5.1. Matériel génomique	53
4.2.2.5.2. Amplification de l'ADN	55
4.2.2.6. Analyses phylogénétiques	58
4.2.2.6.1. Traitement des séquences	58
4.2.2.6.2. Alignement des séquences	58
4.2.2.6.3. Construction des arbres phylogénétiques	59
4.2.2.6.4. Analyses simultanées des séquences	59
4.2.2.6.5. Visualisation des arbres phylogénétiques	63
4.2.2.7. Caractérisation morphologique et culturelle des isolats	63
4.2.2.7.1 Caractères cultureux et aspect morphologique des colonies	63
4.2.2.7.2 Induction de la sporulation sur les brindilles de peuplier	63
4.2.2.8 Le test de pathogénicité	64
CHAPITRE 5 : RESULTATS ET DISCUSSION	66
5.1. Symptômes du dépérissement chez le chêne vert et le chêne liège	66
5.1.1. Symptômes externes	66
5.1.2. Symptômes internes du bois	68
5.1.2.1 Taux de présences des différents types de nécroses dans les quatre régions	70
5.1.2.2 Répartition des types de nécroses dans chaque station expérimentale	70

5.1.2.3. Attribution des types de nécroses selon l'espèce	73
5.2. Agent fongiques isolés	73
5.2.1. Fréquences d'isolement des agents fongiques	73
5.2.2. Répartition géographique des agents fongiques isolés dans les quatre régions	74
5.3 Identification des espèces de la famille des <i>Botryosphaeriaceae</i>	74
5.3.1. Caractérisation moléculaire des <i>Botryosphaeriaceae</i>	74
5.3.1.1 Séquençage et phylogénie	75
5.3.1.1.1. Amplification des ITS	75
5.3.1.1.2. Amplification du gène du facteur d'élongation	76
5.3.1.2 Analyses phylogénétiques	76
5.3.2. Fréquences d'isolement des <i>Botryosphaeriaceae</i>	83
5.3.3. Caractérisation morphologiques des espèces des <i>Botryosphaeriaceae</i>	84
5.4. Test de pathogénicité	87
5.5. Discussion	89
CONCLUSION	94
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

INTRODUCTION

« Chêne » est le nom de nombreuses espèces d'arbres et d'arbustes appartenant au genre *Quercus* et à certains genres apparentés de la famille des fagacées, notamment *Cyclobalanopsis* et *Lithocarpus*. Ce genre, présent dans tout l'hémisphère Nord et dont l'aire de répartition s'étend depuis les froides latitudes jusqu'aux zones tropicales de l'Asie et des Amériques, comprend à la fois des espèces à feuilles caduques et d'autres à feuilles persistantes. [1]

Parmi les espèces de chêne les plus répandues et les plus importantes, nous pouvons citer le chêne-liège (*Quercus suber* L), qui est une essence forestière remarquable, qui présente une grande valeur économique, grâce à sa particularité physiologique qui le distingue des autres ligneux, à reproduire une nouvelle écorce subéreuse appelée communément : liège ; nous trouvons aussi le chêne vert (*Quercus ilex*) qui occupe une place importante au niveau du bassin méditerranéen, notamment dans sa partie occidentale. Il est particulièrement abondant en Afrique du Nord, notamment au Maroc et en Algérie où il constitue, avec le pin d'Alep, l'une des essences majeures du patrimoine forestier [1].

En Algérie, les chênes (Vert, Liège, Zeen, Kermès et Afarès) représentent un capital forestier important ; ils couvrent des superficies étendues, notamment dans le Nord et le Nord-Est, soit environ 40 % de la forêt algérienne [2].

Cependant, la couverture forestière algérienne a connu durant ces cinquante dernières années une très grande destruction causée par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques ; sa superficie, estimée à 1.3 millions d'hectares de vraies forêts naturelles, connaît une régression quasi exponentielle et se trouve aujourd'hui dans un état atterrant. [3] ; Les phénomènes de déclin et de mortalité des arbres de chêne ont été signalés dans toute l'Europe du Sud et l'Afrique du Nord depuis le début des années 1980 [4] ; [5].

Les études réalisées durant les trente dernières années sur la dégradation des écosystèmes des chênes dans la région méditerranéenne ont aidé à clarifier de nombreux aspects de l'étiologie de cette maladie ; par exemple, en plus du rôle joué par de nombreuses espèces de *Phytophthora* et *Pythium* comme agents de

pourriture des racines, une pléthore d'agents pathogènes fongiques tels que *Biscogniauxia mediterranea*, *Pleurophoma cava*, ainsi que plusieurs membres de la famille des *Botryosphaeriaceae* ont été fréquemment rapportés comme des agents responsables de chancre du tronc et de dépérissement des branches, [6].

Au cours d'une étude sur les espèces de *Botryosphaeriaceae* impliquées dans le déclin et la mortalité de *Quercus afares Pomel* (une espèce hybride), *Q. canariensis Willd.* (Chêne algérien) et de chêne liège en Tunisie, *D. corticola* a été trouvée comme étant le principal agent causal de dépérissement. [6]

En Algérie, peu d'intérêt est accordé à l'étude des dépérissements des arbres fruitiers et forestiers, et peu de travaux traitent de ceux causés par des *Botryosphaeriaceae* ; les travaux de recherche réalisés jusqu'à présent sur le dépérissement du chêne (*Quercus sp.*) en Algérie restent très rares ; nous citons les travaux réalisés par Belhocine et al. [7] où plusieurs espèces fongiques ont été isolées à partir *Quercus suber* dont *Botryosphaeria corticola*.

L'objectif de la présente contribution, menée dans quatre régions différentes en Algérie, consiste à rechercher, identifier et caractériser morphologiquement et par des techniques moléculaires les agents pathogènes appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae* impliqués dans le dépérissement du chêne (*Quercus suber* et *Quercus ilex*) en Algérie. Pour cela, quatre régions ont été choisies, à savoir El Kala, Batna, Blida et Tlemcen ; notre étude comporte plusieurs étapes :

- Prélèvement de branches et de troncs de chêne présentant des symptômes de dépérissement dans les quatre parcs nationaux.
- Description des différents types de nécroses en réalisant différentes coupes transversales au niveau des branches et des troncs échantillonnés.
- Isolement des différents agents fongiques à partir des buchettes coupées à la limite du bois nécrosé et sélection des *Botryosphaeriaceae*.
- Séquençage de quelques isolats sélectionnés.
- Construction des arbres phylogénétiques sur la base des ITS et EF.
- Caractérisation morphologique des isolats identifiés.
- Réalisation du Test de pathogénicité, et vérification du postulat de Koch.

CHAPITRE 1

PRESENTATION DU CHÊNE

Le *Quercus* est sans doute l'un des genres forestiers le plus riche en espèces, mais aussi un des plus controversés ; il existe, selon les critères de classification adoptés, de 394 à 448 espèces [8] dont 6 existent en Afrique du Nord [5].

1.1. Chêne liège

Le chêne liège est l'une des essences les plus importantes dans la forêt méditerranéenne. Pour les pays de son aire naturelle, le chêne-liège est une source de valeurs économique, environnementale et sociale. Le liège est aussi l'un des rares produits forestiers qui présente un bilan commercial positif dans l'Union Européenne [8].

1.1.1. Taxonomie

Le chêne liège (*Quercus Suber L.*) est un arbre circonscrit en Méditerranée Occidentale depuis l'ère tertiaire, ce qui lui donne une soixantaine de millions d'années d'existence. Il est décrit pour la première fois par LINNEE en 1753. [2] D'après BENSEGHIR [3] in [4], le chêne liège est connu en Algérie, selon les noms vernaculaires suivants:

- El Féline: Cette dénomination est probablement d'origine grecque (*Phellodrus*:Phellos/liège).
- Akhnache (liège) dans la région de la Petite Kabylie.
- Aqchour dans la région de la Grande Kabylie.
- Fernane à l'Est du pays.

Le chêne liège appartient au règne des *Plantae*, au sous règne des *Tracheobionta*, à la division des *Magnliophyta* (Angiospermes), à la classe des *Magnoliopsida* (Dicotylédones), à la sous classe des *Hammamelidae*, à l'ordre des *Fagales*, à la famille des *Fagaceae* (Cupulifères), au genre *Quercus* et à l'espèce *Quercus suber* [6].

Quercus suber est relativement polymorphe ; de nombreuses variétés ont été décrites. AIME [6], signale que le genre *Quercus* pose un problème polygénétique qui n'est toujours pas résolu, il met l'accent sur le problème posé sur *Quercus suber* et les espèces voisines : *Quercus pseudo suber* et *Quercus cerris*.

1.1.2. Aire de répartition

1.1.2.1 Aire de répartition mondiale

Le chêne-liège est circonscrit à la région de la Méditerranée occidentale et déborde le long du sud de la façade atlantique depuis le Maroc jusqu'au Golf de Gascogne entre les latitudes Nord 31° et 45° où les influences de la mer et de l'océan permettent de tempérer la grande amplitude des oscillations thermiques et l'aridité de la saison estivale du climat méditerranéen au sens strict [9]. Le chêne-liège est une essence endémique de la Méditerranée occidentale [10], [11].

Le chêne liège occupe environ 2,7 millions d'hectares (Tableau 1.1) dont 1,7 millions en Europe (Portugal, Espagne, Italie, France) et le reste en Afrique du Nord (Algérie, Maroc, Tunisie) (Figure 1.1)

Tableau1.1 : La surface couverte par le chêne liège dans le bassin méditerranéen [12]

PAYS	Superficie (hectares)	%
Portugal	860.000	32
Espagne	725.000	27
Maroc	440.000	16,4
Algérie	375.000	14
Tunisie	144.000	5,3
Italie	99.000	3,7
France	44.000	1,6



Figure 1.1: Distribution du chêne-liège dans son aire géographique méditerranéenne et atlantique [13]

1.1.2.2 Aire de répartition en Algérie

Le chêne-liège est une espèce forestière principale en Algérie, tant en raison des superficies occupées, que de son importance économique. Il est présent sur 375 000 ha, mais ne constitue de véritables subéraies que sur 150 000 ha répartie sur plusieurs wilayas (tableau 1.2) [14].

En Algérie, la forêt de chêne liège est localisée entre le littoral et une ligne passant approximativement par Tizi-Ouzou, Kherrata, Guelma et Souk-Ahras (Figure 1.2). Elle est également représentée à l'Ouest dans la région de Tlemcen et Mascara. Selon YALAOUI [15], un dernier inventaire indique qu'il est possible

de revaloriser environ 440.000 ha de forêts pouvant favoriser le développement du chêne-liège.

Tableau 1.2 : Superficie des subéraies en Algérie [16]

Subéraies orientales		Subéraies occidentales	
Skikda	40 000 ha	Tlemcen	2 000 ha
Jijel – El-Milia	40 000 ha	Chleff	3 000 ha
Guelma	20 000 ha	Médéa	2 00 ha
Annaba - El-Tarf	30 000 ha	Blida	1 000 ha
Tizi-Ouzou	10 000 ha		
Bouira	1 500 ha		
Total	141 500 ha		6 200 ha

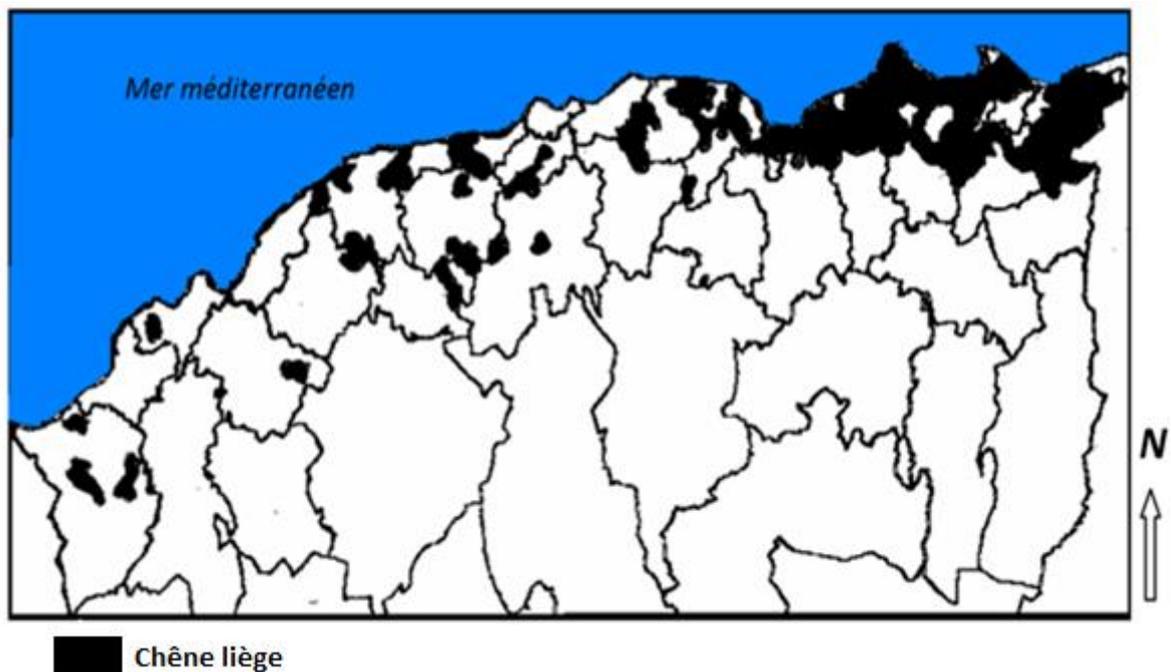


Figure 1.2 : Aire naturelle de répartition du chêne liège en Algérie [17]

1.1.3. Importance économique

En raison de la qualité de son écorce et de son bois, le chêne-liège est du point de vue économique, l'essence forestière la plus importante d'Afrique du nord [18].

L'évolution des subéraies et de leur exploitation tout au long du XXème siècle a connu un développement très remarquable, essentiellement au niveau de l'industrie. Celle-ci a connu un grand essor à partir des années 50. Le chêne liège doit sa noblesse à son écorce appelée communément liège qui offre un potentiel économique non négligeable dans diverses utilisations (agglomérés d'isolation, revêtement, décoration, bouchons et articles divers). Il est utilisé aussi pour son bois (charbon de bois, bois de chauffage..), pour son écorce à tannin et pour ses fruits (glands) et feuilles qui servent au bétail [19].

La production mondiale de liège en 2009 est estimée à 300.000 tonnes. (Tableau 1.3) dont celle de l'Algérie qui occupe la quatrième place avec une production de 15.000 tonnes/an de liège brut [20].

Tableau1.3 : Production mondiale du liège [20]

PRODUCTION DE LIÈGE		
Pays	Production moyenne annuelle (T)	Pourcentage
Portugal	157,000	52,5
Espagne	88,400	29,5
Italie	17,000	5,5
Algérie	15,000	5,2
Maroc	11,000	3,7
Tunisie	7,500	2,5
France	3,400	1,1
Total	299,300	100

1.1.4. Caractérisation botanique

Le chêne liège est un arbre de petite taille (Figure 1.3), pouvant néanmoins atteindre 25m. Son port est variable en fonction de la densité du peuplement [9].

Le chêne liège est toutefois une espèce héliophile, il présente un couvert léger laissant passer la lumière. Il peut vivre jusqu'à 250 à 300 ans, mais les levées successives, les éventuels incendies et les conditions stationnelles diminuent fortement cette longévité [21].

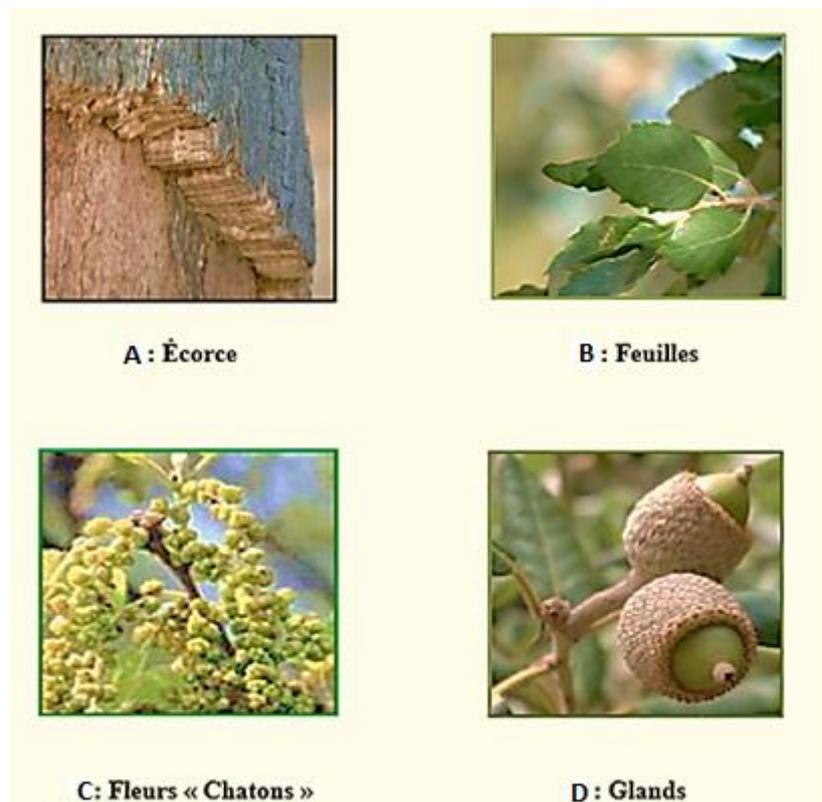


Figure 1.3 : Caractéristiques botaniques et reproductrices du chêne liège [22]

Il s'agit d'un chêne avec des feuilles persistantes (Figure 1.3.B), de forme ovale, coriace. Le pétiole est court. Les feuilles de plus d'un an meurent et tombent quelques mois après le développement des jeunes feuilles [23].

Les fleurs mâles (Figure 1.3.C) apparaissent en bouquet entre Avril-Mai à l'extrémité des pousses de l'année. Le fruit ou gland (Figure 1.3.D), rarement comestible par l'homme à cause de son goût amer, se forme dans l'année et tombe d'octobre à Novembre jusqu'à Janvier [24].

C'est une espèce qui présente une floraison et fructification très précoce, quelques fois dès l'âge de 12 à 15 ans [25]. L'originalité de cette espèce est de produire une écorce épaisse périodiquement récoltable sans trop affaiblir les arbres, fournissant du liège (Figure 1.3.A), matériau assez unique pour ses propriétés physiques, chimiques et esthétiques [26].

1.1.5. Importance écologique

L'importance écologique du chêne liège réside dans son rôle de conservation des sols et la lutte contre la désertification. C'est aussi un anti polluant de l'environnement par la séquestration du dioxyde de carbone et la lutte contre l'effet de serre atténuant ainsi les effets du changement climatique. En effet, les forêts de chêne liège dans le monde absorbent environ 14 millions de tonnes de CO₂/an. Il faut aussi savoir qu'un arbre écorcé absorbera 3 à 5 fois plus de CO₂ qu'un autre non écorcé. Le chêne liège contribue aussi à la recharge des réserves en eau et au contrôle des ruissellements. D'autre part, la forêt du chêne liège abrite une biodiversité considérable [27].

1.1.6. Caractérisation écologique

- L'essence est héliophile, c'est à dire de pleine lumière et exigeant une forte insolation. donc c'est en peuplement pur, voire en lisière des parcelles, qu'elle se développera le mieux [18].
- Le chêne liège est exigeant en chaleur. Des lésions irréversibles apparaissent sur les feuilles en dessous de -5°C. Il demande des précipitations moyennes annuelles supérieures à 600mm [28].
- Le chêne liège préfère les sols aérés, profonds, frais, riches en matière organique, acides et franchement siliceux. Il fuit les calcaires actifs et les sols hydromorphes [9].

1.2. Chêne vert

Le chêne vert (*Quercus ilex* L.) est une espèce sclérophylle et sempervirente très abondante dans l'Ouest du bassin méditerranéen ; elle est généralement scindée en deux sous-espèces : *Q. ilex sensu stricto* répandue depuis les Alpes Maritimes jusqu'en Turquie et *Q. ilex Rotundifolia* (Lam.) présente de la péninsule ibérique à l'Afrique du Nord [29]

1.2.1. Taxonomie

La taxonomie de *Quercus ilex* est identique à celle de *Quercus suber*. Le chêne vert fait partie des *Plantae*, du sous règne des *Tracheobionta*, de la division des *Magnliophyta* (Angiospermes), de la classe des *Magnoliopsida* (Dicotylédones), de la sous-classe des *Hammamelidae*, de l'ordre des *Fagales*, de la famille des *Fagaceae* (Cupulifères), du genre *Quercus* et de l'espèce *Quercus ilex* L.[30].

1.2.2. Aire de répartition

1.2.2.1. Aire de répartition mondiale

Le chêne vert est une espèce dont la répartition est très vaste et que l'on trouve depuis l'Himalaya jusqu'en Grande Bretagne, mais il est toutefois difficile d'en faire une bonne distribution géographique [24].

C'est surtout une espèce méditerranéenne, selon SEIGUE [24], l'aire de répartition du chêne vert s'étend sur l'ensemble du bassin méditerranéen et c'est dans le bassin occidental qu'il est le plus répandu (Figure 1.4) où il constitue, avec ses 2.000.000 ha, un des arbres forestiers les plus importants de la région méditerranéenne [1]. La plus vaste superficie du chêne vert se trouve en Espagne, au Maroc et en Algérie (tableau 1.4).

Tableau 1.4 : Répartition du chêne vert (*Quercus ilex*) dans quelques pays du bassin méditerranéen [24]

Pays	Superficie (ha)
Espagne	2 890 000
Portugal	530 000
France	350 000
Italie	380 000
Tunisie	80 000
Algérie	680 000
Maroc	1 340 000
TOTAL	6 250 000

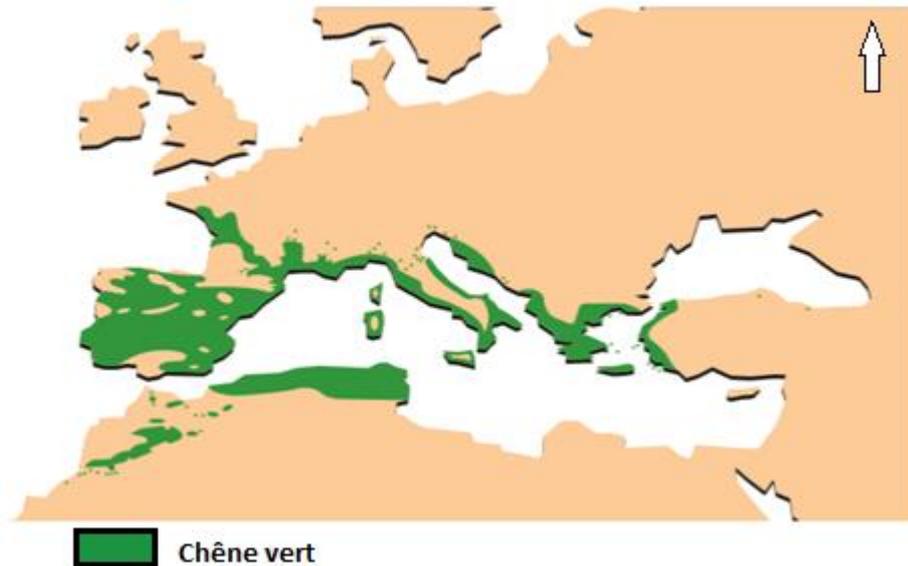


Figure 1.4 : Aire de répartition méditerranéenne du chêne vert [29]

1.2.2.2. Aire de répartition en Algérie

En Algérie, le chêne vert est l'une des essences forestières les plus répandues [31], [32]. Il est classé au 2^{ème} rang en superficie après le pin d'Alep et le chêne liège, soit environ 680 000 ha [1].

Du point de vue biogéographique, le chêne vert s'étend dans toute l'Algérie du nord (figure 1.5) allant du littoral à l'Atlas saharien et de la frontière marocaine à la frontière tunisienne [1]. Sa vaste amplitude écologique lui permet de couvrir les deux domaines maghrébin-méditerranéen et maghrébin – steppique [33].



Figure 1.5 : Répartition du chêne vert en Algérie [34]

1.2.3. Importance économique

Le chêne vert est une essence présentant une valeur économique plus au moins faible. En effet, la qualité médiocre de son bois ne permet pas son utilisation en menuiserie. Il est cependant utilisé pour la fabrication de manches d'outils, de panneaux de fibres et de particules [1].

En étant un bois très lourd, très dur, compact, il fournit par contre un bois de chauffe et un charbon d'excellente qualité [35].

Les écorces du chêne vert sont utilisées pour l'extraction des tanins, substance très recherchée par le secteur industriel en raison de son excellente qualité [36]. Les feuilles du chêne vert sont utilisées en médecine. Elles sont employées, en usage interne, contre les hémorragies, les dysenteries, les vers intestinaux et les ulcères. En usage externe, elles sont préconisées pour les dartres et les maladies de la peau [24]. Les fruits du chêne, quant à eux, sont comestibles et font l'objet d'un commerce non négligeable [37].

1.2.4. Caractérisation botanique

C'est une essence forestière qui possède ses caractéristiques morphologiques propres et ne peut être confondue avec les autres chênes [38] ; elle peut facilement atteindre 300 ans [31].

Le chêne vert est un arbre de moyenne dimension, de 5 à 10 mètres de hauteur, mais qui peut atteindre 20 mètres en milieu humide. Il présente un tronc unique, trapu, tortueux et robuste, à écorce finement fissurée, de couleur brune grisâtre et qui apparaît sous forme de petits carrés (Figure 1.6). [18].

Le chêne vert présente un système racinaire pivotant pouvant atteindre 10 mètres et un houppier ovale avec un couvert épais à ramifications serrées et denses [40].

Les feuilles sont alternes, coriaces, petites (3 à 8 cm de long, 1 à 3 cm de large), de forme variable [41]. Comme leur durée de vie est de deux ans et leur répartition est aléatoire sur les rameaux, l'arbre est sempervirent [42].

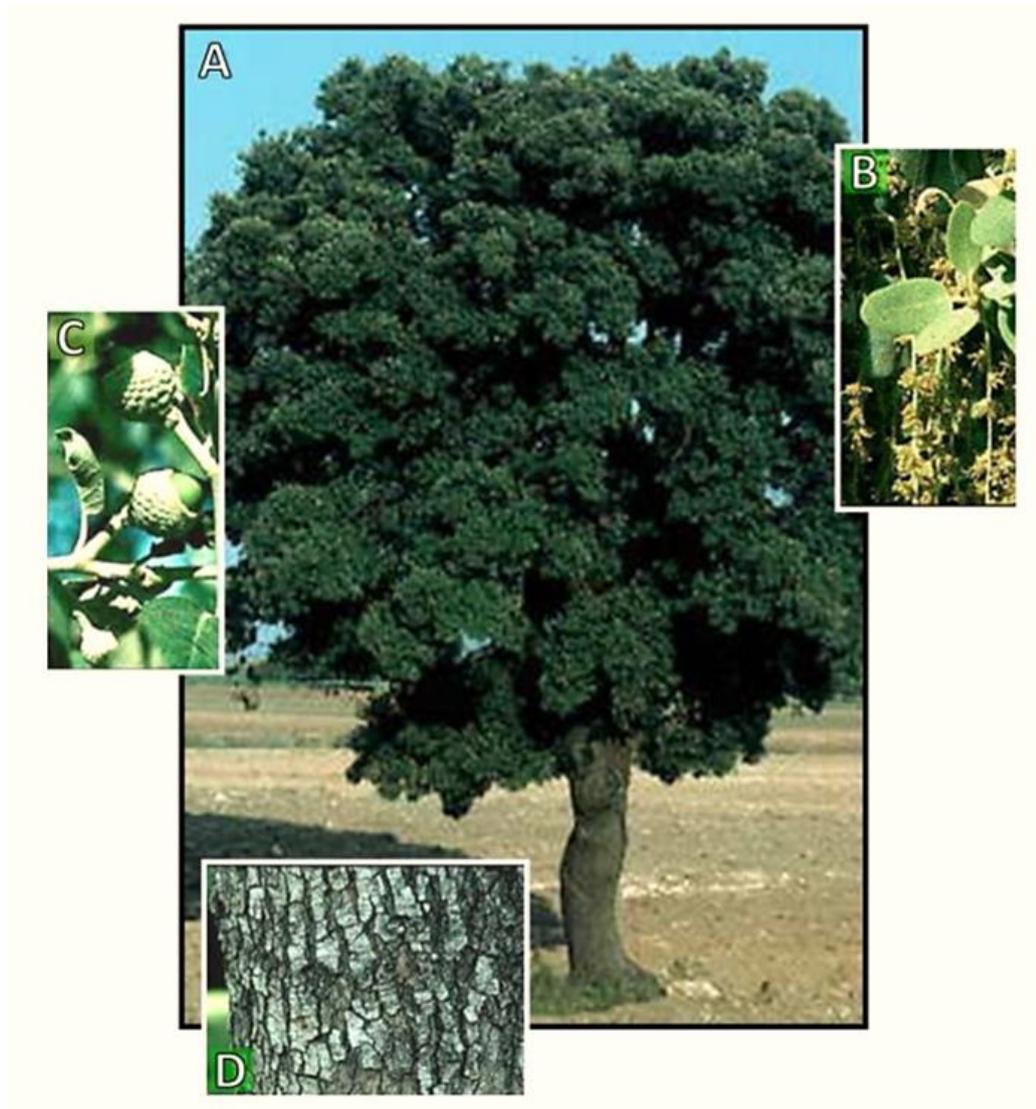


Figure 1.6 : Aperçu de l'ensemble du chêne vert (*Quercus ilex*)
 A. Chêne vert sur pieds, B. Fleurs (chatons), C. Fruits (gland), D. écorce
 [39]

Les fleurs sont unisexuées, les fleurs mâles étant très abondantes. Ce sont des chatons pendant à la base des pousses de l'année. La fructification est annuelle (de Novembre à Décembre) et se produit dès l'âge de 10 à 12 ans [43].

1.2.5. Exigences écologiques

Quercus ilex est rencontré sur des altitudes de 500m en France et 1300m en Espagne et jusqu'à 1500m en Algérie et au Maroc [18].

D'après SEIGUE [24], le chêne vert est une espèce thermophile et héliophile. Il présente une grande amplitude écologique car il s'accommode à tous

les types de sol. Il se développe surtout sur des sols calcaires où il est moins concurrencé.

Le chêne vert montre des potentialités et une adaptabilité très élevées. C'est une espèce très plastique qui s'accommode, dans un contexte méditerranéen, de conditions climatiques et édaphiques variées [44]. Son adaptation au stress climatique lui permet de survivre avec un minimum pluviométrique de 250mm [45] et de supporter des extrêmes thermiques de -15°C et de $+42^{\circ}\text{C}$ [46].

CHAPITRE 02

DEPERISSEMENT DU CHÊNE

2.1. Généralités sur le dépérissement

2.1.1. Définition du dépérissement

Les dépérissements forestiers, appelés aussi le « dépérissement des forêts », ont constitué un thème environnemental de premier ordre au cours des années 1980 [29].

Pour ZINE EL ABIDINE [47], BADRAOUI ET ASSALI [48], en termes de symptomatologie, les dépérissements forestiers sont définis comme étant « des phénomènes causés par un ensemble de facteurs interagissant et se succédant d'une façon particulière entraînant ainsi une détérioration générale et graduelle de la santé de l'arbre dont l'issue n'est pas toujours fatale ». Pour MANION [49] in [50], ce sont des phénomènes complexes évolutifs qui résultent de « l'interaction de facteurs abiotiques et biotiques intervenant dans un ordre spécifique pour provoquer une détérioration générale progressive causant le plus souvent la mort des arbres »

2.1.2. Facteurs du dépérissement

Un dépérissement est un processus évolutif, faisant intervenir de multiples causes qui agissent en synergie [51]. Elles peuvent être purement naturelles, humaines ou une combinaison des deux [52], [51]. Le dépérissement est considéré comme un enchaînement d'événements défavorables ; les facteurs qui prédisposent aux maladies entraînent lentement l'arbre vers les facteurs incitatifs qui accentuent sa perte de vigueur ; à leur tour, d'autres facteurs contribuent à amener le végétal vers une mort certaine [49] in [53], la figure 2.1 représente les principaux facteurs du dépérissement.

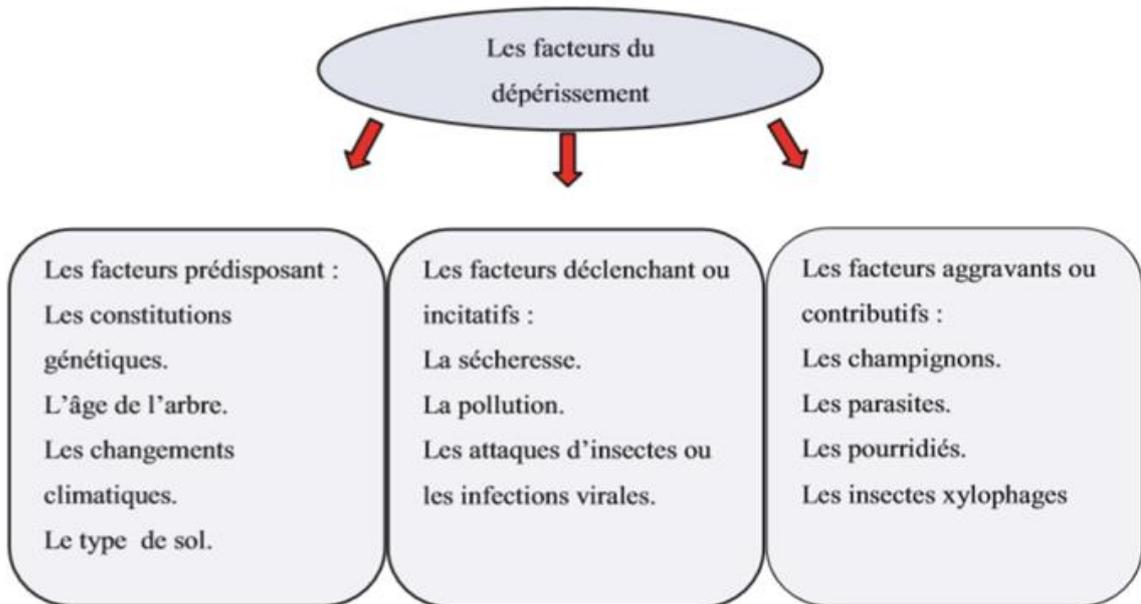


Figure 2.1 : Les facteurs du dépérissement des arbres forestiers [49]

2.1.3. Les symptômes du dépérissement

La description d'une maladie observée sur une plante-hôte nécessite impérativement des connaissances étiologiques préalables. Selon LANIER [54], les symptômes sont les indicateurs les plus évidents des maladies. Ils jouent ainsi le premier rôle dans l'établissement du diagnostic.

Le dépérissement peut être traduit par une perte de vitalité progressive (Figure 2.2), des mortalités d'organes pérennes (branches, rameaux notamment chez les feuillus) ou des pertes prématurées d'aiguilles chez les conifères [51].

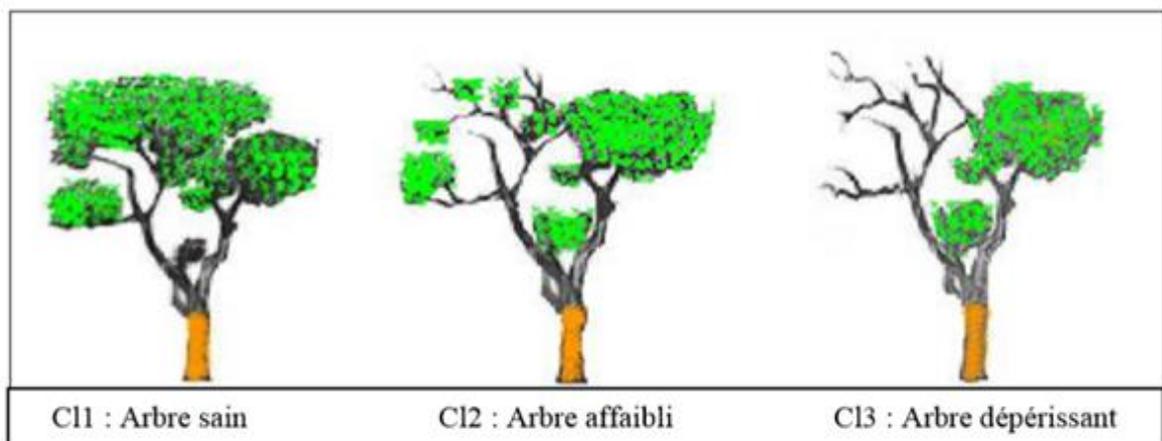


Figure 2.2 : Illustration explicative de classes de défoliation du chêne [55]

2.1.4. Les types de dépérissement

Les types de dépérissement se distinguent selon leur évolution [56]. On distingue trois types : -

- Le dépérissement brusque : Il apparait pendant quelques semaines, se manifeste par un dessèchement des feuilles qui restent pendantes sur leurs rameaux.
- Le dépérissement rapide : Il peut apparaitre durant une ou deux années, et conduit à une mort brusque d'organes ciblés. -
- Le dépérissement lent : ce type apparait pendant plusieurs années.

2.2. Dépérissement du chêne en Algérie

Les problèmes sanitaires du chêne en Algérie remontent au début du siècle suite à l'apparition du phénomène du dépérissement surtout à l'Ouest du pays, sur des jeunes sujets (moins de 15 ans) et des arbres adultes [14]. Actuellement, la majorité des forêts algériennes se trouve dans un état déplorable et une grande partie est vouée encore à disparaître [57].

2.2.1. Facteurs de dépérissement du chêne en Algérie

Le dépérissement peut s'expliquer par la conjonction de trois types de facteurs (Figure 2.3):

- a- Les facteurs prédisposants : qui caractérisent les peuplements vieillis, récemment incendiés en exposition sud, ou sur station à trop faible réserve en eau.
- b- Les facteurs déclenchants : comme les épisodes de sécheresse estivale qui ont marqué ces dernières années et qui ont considérablement affaibli les arbres relativement exigeants en eau.
- c- Les facteurs aggravants : les facteurs prédisposants et/ou déclenchants ne provoquent pas à eux seuls le dépérissement des arbres. Il est nécessaire que des facteurs aggravants interviennent tels les insectes, les champignons ou encore l'homme [57]

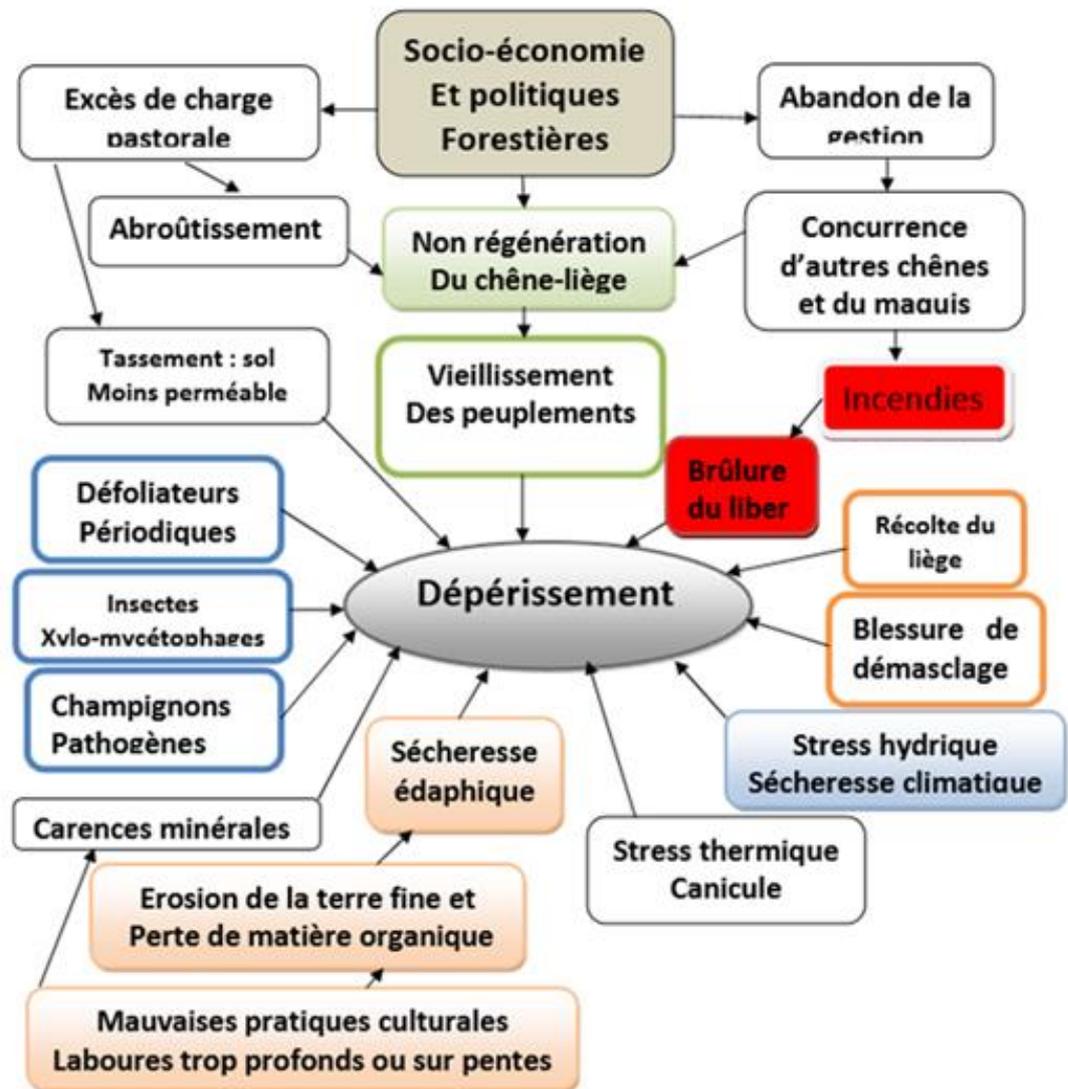


Figure 2.3 : Dépérissement du chêne liège résultant de multiples interactions [8]

2.2.1.1. Les facteurs écologiques

- Le Feu

Le feu est un facteur écologique quasi-universel [62]. En région méditerranéenne, il est un facteur catastrophique lorsqu'il sévit à des intervalles très rapprochés et sur de grandes surfaces. En général, la plupart des incendies ont eu lieu durant la saison estivale où la sécheresse atteint son maxima.

Le chêne vert est moins sensible à l'action du feu que d'autre essences, car le sous-bois est moins bien développé, ce qui le rend beaucoup moins inflammable. Les dégâts sont peu importants dans les futaies, mais le feu peut entraîner un retard de 5 à 6 ans de l'évolution du boisement [31].

- **La neige**

La neige cause des dégâts non négligeables. En effet les jeunes branches se cassent sous le poids de la neige et on observe sur un seul arbre de nombreux rameaux morts [31].

2.2.1.2. Les facteurs anthropiques

Les forêts de chêne vert auraient été dégradées par des abus de coupes, par les incendies et par les pâturages. Cela se traduit par une modification plus ou moins rapide de la flore et un grand retard dans leur régénération [63].

- **Les abattages illicites**

Les riverains utilisent le bois du chêne vert pour le chauffage en premier lieu. Puis pour l'ébénisterie et la phytothérapie, car le chêne vert est utilisé, grâce à ses glands et le tanin de son écorce, contre les ballonnements, les hémorragies, les plaies, et les diarrhées. De ce fait les coupes illicites sont nombreuses et désordonnées, sans aucun respect pour la forêt [63].

- **Les pâturages**

La régénération est insignifiante à cause des surpâturages. Les forêts sont utilisées comme terrains de parcours de grands troupeaux bovins en liberté totale, malgré l'intervention des forestiers. Ces pâturages excessifs sont des facteurs majeurs de dégradation et risquent la destruction progressive des forêts [63].

2.2.1.3. Les facteurs phytosanitaires

- **Les maladies**

Les dégâts du charbon de chêne, *Biscogniauxia mediterranea* (= *Hypoxylon mediterraneum*) sont connus depuis longtemps en Algérie et au Maroc [64]. C'est l'un des champignons les plus communément associés au dépérissement des chênes méditerranéens.

De plus un autre champignon, *Ophistoma roboris* a été observé sous l'écorce [63]. Ce dernier attaque les arbres de l'intérieur et les détruit. Ces

champignons sont apparus à la suite d'une période de sécheresse ayant duré trois années de suite (de l'année 2000 à 2002) et perdurent jusqu'à présent.

Selon IDJER et al. [65], l'impact du chancre sur le peuplement de chêne est considérable. Sur les jeunes sujets infectés, un fendillement de l'écorce s'observe, ce qui favorise les invasions des insectes.

- **Les déprédateurs**

Le chêne n'échappe pas aux nombreux déprédateurs. Nous pouvons citer à titre d'exemple, les insectes phyllophages, particulièrement des Lépidoptères : (tortricidés, géométridés), les insectes xylophages, surtout des Coléoptères cérambycidés, les suceurs de sève (Hémiptères), qui réduisent la croissance des arbres ; de plus, ces insectes favorisent l'attaque des champignons et la pénétration de parasites et de virus, ce qui accentue l'affaiblissement de l'arbre [58].

CHAPITRE 03 : GENERALITEES SUR LA FAMILLE DES *BOTRYOSPHAERIACEAE*

3.1. La famille des *Botryosphaeriaceae*

3.1.1. Définition

La famille des *Botryosphaeriaceae* englobe un éventail de divers champignons qui sont des agents pathogènes, des endophytes ou des saprobes, se développant, principalement, sur les hôtes ligneux. Ils se trouvent dans toutes les zones géographiques et climatiques du monde, à l'exception des régions polaires. Leur association fréquente avec les maladies des plantes a suscité un intérêt considérable portant essentiellement sur la systématique des espèces et des genres. [66].

3.1.2. Distribution des *Botryosphaeriaceae*

Les espèces de *Botryosphaeriaceae* sont distribuées dans les climats tempérés et tropicaux à travers le monde et se produisent sur une grande variété de plantes hôtes [67].

3.1.3. Caractéristiques des *Botryosphaeriaceae*

Des descriptions détaillées de la famille des *Botryosphaeriaceae* ont été présentées par plusieurs auteurs [68]; [69]; [70]; [71]; [72]; [73]. Les *Botryosphaeriaceae* ont été caractérisés principalement sur la base de leurs grandes ascospores aseptées, ovoïdes à oblongues et habituellement hyalines.

Récemment, au moins six lignées de la famille ont été reconnues comme ayant des ascospores pigmentées, et dont trois ayant les ascospores cloisonnées [74]. Par conséquent, cette simple circonscription ne peut plus être considérée comme étant appropriée pour le *Botryosphaeriaceae*.

LIU et al [75] a récemment fourni une définition dans laquelle il considérait que leurs ascospores sont hyalines et aseptées, mais qui pourraient devenir pigmentées et cloisonnées avec l'âge.

Cette définition est également inadaptée parce les ascospores, dans certains genres, peuvent devenir pigmentées et cloisonnées à un stade précoce de leur développement, longtemps avant qu'elles ne peuvent être considérées comme âgées.

De plus, une circonscription basée uniquement sur l'état sexuel ne convient pas, surtout depuis que certaines espèces ne sont connues que par leur forme asexuée, tandis que chez d'autres, l'état sexuel est extrêmement rare [66].

Ces champignons peuvent vivre comme des endophytes dans les organes de la plante, dans une phase de latence, sans produire de symptômes clairs et la maladie n'émergera qu'après l'apparition de conditions défavorables à l'arbre [76].

3.1.4. Les symptômes des *Botryosphaeriaceae*

Les plantes infectées peuvent présenter une multitude de symptômes comme la brûlure des pousses (Fig 3.1.c), des chancres sur la tige (Fig 3.1.d.e.f), la pourriture des fruits, le dépérissement et la gommose (Fig 3.1.a) [77].

3.1.5. Les genre des *Botryosphaeriaceae*

Lorsque THEISSEN et SYDOW [78] ont présenté les *Botryosphaeriaceae*, ils ont inclu trois genres, à savoir *Botryosphaeria*, *Phaeobotryon* et *Dibotryon*.

D'autres genres ont été inclus au fil des années et l'ajout de noms distincts pour les formes sexuées et asexuées a abouti à l'inclusion d'au moins 78 genres de la famille [79].

Beaucoup de ces genres ont été déterminés comme des synonymes, de nouveaux genres ont été introduits, certains, anciens ont été ressuscités, d'autres encore ont été transférés à d'autres familles. LIU et al [75] a reconnu 29 genres dont 17 sont connus en culture.

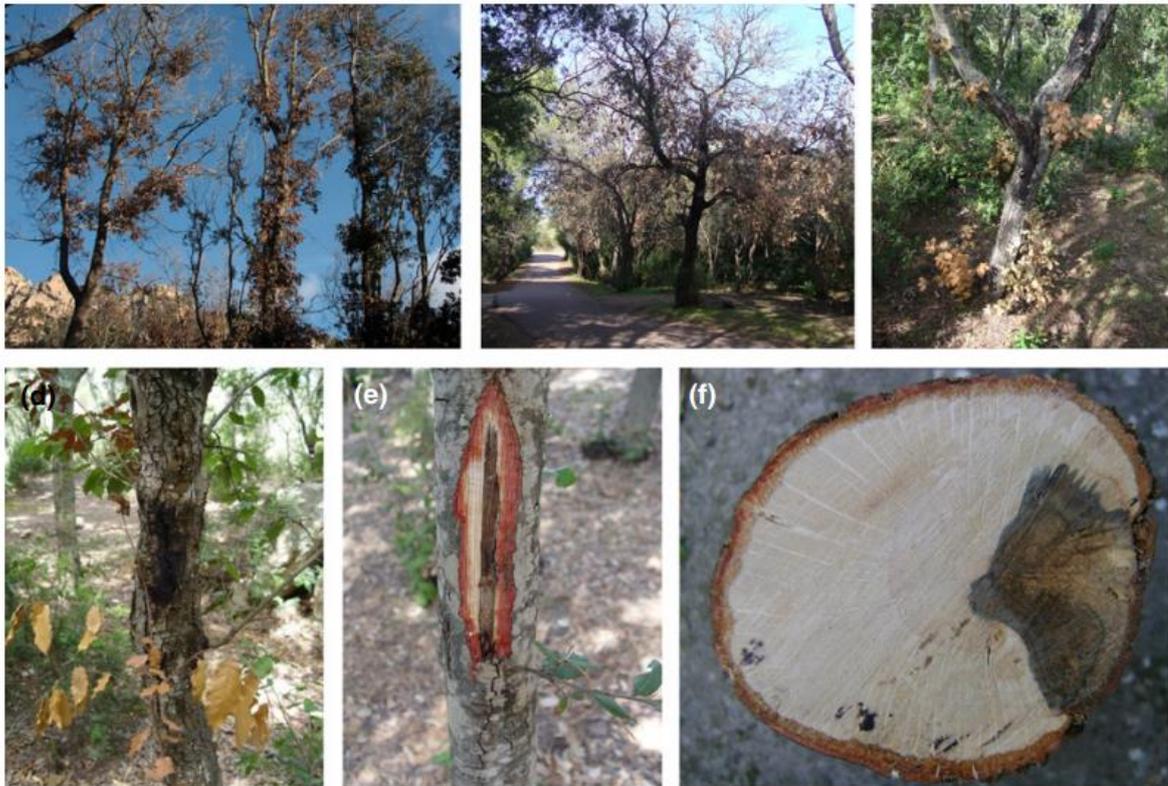


Figure 3.1 : Les principaux symptômes de dépérissement sur *Quercus* causés par des *Botryosphaeriaceae*: [67] ; [80]

(a) le dépérissement des branches, chlorose des feuilles ; (b) mort subite d'arbres matures; (c) flétrissement des nouvelles pousses; (d) un chancre dans le tronc; (e) étendue de la lésion nécrotique; (f) section d'un chancre de branche

L'application de l'analyse de séquences d'ADN et la classification phylogénétique ont eu un impact majeur sur la systématique des *Botryosphaeriaceae* [81]. Cependant, l'ensemble des données LSU (the large subunit) que CROUS et al. [81] ont utilisées ne pouvait pas résoudre le grand clade qui comprenait *Diplodia* et *Lasiodiplodia*, genres apparentés avec des conidies pigmentées.

PHILLIPS et al. [74] ont tenté de résoudre la phylogénie et le statut taxonomique des espèces des *Botryosphaeriaceae* avec des ascospores pigmentées. Dans une phylogénie basée sur les SSU (the small subunit), les ITS (ribosomal DNA internal transcribed spacer) et les LSU (the large subunit) utilisés ensemble, combinés avec les données de séquence du facteur d'élongation EF1-

α et la β -tubuline ont résolu six clades dans le complexe *Diplodia/Lasiodiplodia* et quatre clades supplémentaires dans les *Botryosphaeriaceae*.

Enfin, PHILLIPS et al [66] ont introduit de nouvelles familles pour accueillir *Saccharata* (*Saccharataceae*), *Melanops* (*Melanopsaceae*), *Aplosporella* et *Bagnisiella* (*Aplosporellaceae*). Ainsi, 17 genres peuvent maintenant être phylogénétiquement reconnus dans les *Botryosphaeriaceae* (Figure 3.2).

3.1.5.1. Généralités sur *Diplodia corticola*

D. corticola est un opportuniste qui entre dans les plantes par des blessures, les cicatrices foliaires ou les stomates ouvertes pour les échanges de gaz. Le champignon peut coloniser les tissus morts, puis passer dans les tissus sains dans la branche ; Il a été identifié pour la première fois dans les années 1980 dans les chênes lièges (*Quercus suber* L.) dans les pays méditerranéens où il a dévasté l'industrie du liège. (Le mot « corticola » est dérivé de la racine latine pour « liège »). [82]

3.1.5.2. Généralités sur *Botryosphaeria Dothidea*

Cette espèce est un agent pathogène opportuniste qui provoque des chancres sur les branches, les tiges, et / ou les brindilles. L'infection se produit souvent lorsque les arbres sont prédisposés par les facteurs de stress environnementaux (par exemple, la sécheresse et les dommages dus au gel), défoliation par les insectes ou les blessures ; *Botryosphaeria dothidea* a une distribution mondiale et une gamme d'hôtes extrêmement larges. Ce champignon est connu pour attaquer environ 170 espèces de plantes, y compris les angiospermes ligneuses et les espèces de conifères. [75]

3.1.5.3. Généralités sur *Dothiorella iberica*

Le genre *Dothiorella* est régulièrement trouvé sur les vignes, ce sont des espèces uniques dans les *Botryosphaeriaceae*. Dans le début des études phylogénétiques, ces espèces ont été regroupées avec *Neofusicoccum*. Parmi les plus importantes espèces de ce genre, *Dothiorella iberica*, connue comme étant pathogène sur de nombreux hôtes du genre *Malus* et *Quercus* dans l'Italie et l'Espagne ; cette espèce peut se développer à des températures variant entre 5°C et 35°C, l'optimum étant de 20°C à 25°C. [83]

3.2. Identification des champignons

3.2.1. Introduction

Il est important de garder à l'esprit que les espèces sont des entités dynamiques et que les concepts pour les décrire se basent habituellement sur des descriptions prises à un moment donné et sur une population donnée. Ainsi, plus il y a de données cumulées sur une espèce, plus la description de l'espèce se rapproche de la réalité [84].

Selon CRACRAFT [85], les espèces de mycètes ne devraient pas être définies selon les mêmes concepts que pour les autres règnes. En revanche, les mycologues TAYLOR et al. [86] et KOHN [87] ont employé les mêmes concepts pour décrire une espèce fongique que ceux utilisés pour les animaux et les plantes.

3.2.2. Méthodes de reconnaissance des champignons

Trois méthodes de reconnaissance d'espèces se démarquent : la reconnaissance morphologique d'espèce (MSR), la reconnaissance biologique d'espèce (BSR) et la reconnaissance phylogénétique d'espèce (PSR).

3.2.2.1. La reconnaissance morphologique d'espèce (MSR)

La reconnaissance morphologique d'espèce (*Morphological Species Recognition*) a longtemps été utilisée et l'est encore quand il est possible de l'appliquer.

Elle se base sur des caractères morphologiques, physiologiques ou biochimiques pour différencier les espèces. Cette reconnaissance est proche du concept typologique pour décrire une espèce. Le concept typologique s'appuie sur un individu «type », plutôt que sur les populations composant l'espèce [85].

La MSR est très limitée en ce qui concerne la caractérisation d'espèces de champignons, étant donné que les traits à analyser sont souvent peu ou pas différents entre les espèces sœurs [88] ; [89] ; [90] ; [91] ; [92].

Tout compte fait, dans le contexte de description d'une nouvelle espèce, il est primordial de relever le plus grand nombre de caractères morphologiques,

écologiques et physiologiques pour bien circonscrire ses limites et pour prouver qu'il s'agit bien d'une entité distincte de celles qui ont déjà été décrites. Toutefois, d'autres méthodes de reconnaissance doivent impérativement être utilisées pour s'assurer de bien catégoriser la nouvelle espèce.

3.2.2.2. La reconnaissance biologique d'espèce (BSR)

La reconnaissance biologique d'espèce (*Biological Species Recognition*) est fondée sur l'isolement reproductif entre les espèces, ce qui protège le pool génétique et donc l'entité de l'espèce [93]. Toujours selon MAYR [93], le degré de différence entre les espèces n'est pas seulement morphologique, mais aussi génétique.

Le principe de l'isolement reproductif est clair pour le règne animal, mais l'est beaucoup moins en ce qui concerne les champignons. Plusieurs d'entre eux sont incapables de se reproduire en milieux artificiels, même s'ils proviennent de la même espèce [92] ; [94].

Il existe également des champignons qu'on nomme homothalliques, qui forment des périthèces sans fécondation croisée comme certaines espèces de *Ceratocystis* et de *Grosmannia* [95] ; [96].

Selon HARRINGTON et RIZZO [84], les tests de croisement (*matching tests*) représentent un outil supplémentaire pour l'identification plutôt qu'un critère de distinction d'espèces.

3.2.2.3. La reconnaissance phylogénétique d'espèce (PSR)

Le plus souvent, il est possible de clarifier les ambiguïtés d'identification et de classification par les méthodes de reconnaissance phylogénétique d'espèce (*Phylogenetic Species Recognition*). En comparaison aux deux autres méthodes de reconnaissance (MSR et BSR) qui prennent en compte que l'espèce est l'unité de l'évolution, la PSR considère l'espèce comme étant le produit de l'évolution [84].

Un intérêt de cette définition est qu'elle inclut les organismes asexués. La phylogénie se base sur les concepts monophylétiques et de concordance

généalogique des groupes que représentent les espèces ; chaque membre d'un groupe monophylétique d'espèces provient d'un ancêtre commun [84] ; [86].

Les analyses phylogénétiques peuvent se baser sur des marqueurs morphologiques ou physiologiques à valeur quantitative (les dimensions de spores, de conidiophores et de périthèces, le taux de croissance à différentes températures ou sur différents milieux de culture). Par contre, les caractères doivent être constants entre les individus d'une même espèce et les données de ces caractères doivent être prises avec rigueur. Ces caractères ne sont pas toujours fiables et précis pour bien définir les espèces de champignons [86] ; [88] ; [92] ; [97]. Les marqueurs moléculaires sont plus appropriés à ce type d'analyse. En plus d'offrir un nombre pratiquement infini de caractères, ils ne sont généralement pas influencés par l'environnement et sont donc plus précis et constants.

Pour être en mesure de bien identifier une espèce, les résultats d'analyses phylogénétiques sont combinés aux résultats des observations de caractères morphologiques, écologiques et si c'est possible, des tests de croisement [84] ; [86] ; [95] ; [98].

CHAPITRE 4

PARTIE EXPERIMENTALE

4.1. Présentation des régions et stations d'étude

La présente étude a eu lieu dans quatre régions de l'Algérie (Figure 4.1), à savoir les forêts de chêne du Parc National d'El Kala dans la wilaya d'El Taref, celles du Parc National de Chréa à Blida, les forêts de chêne vert du Parc national de Belezma à Batna et celles du Parc National de Tlemcen.

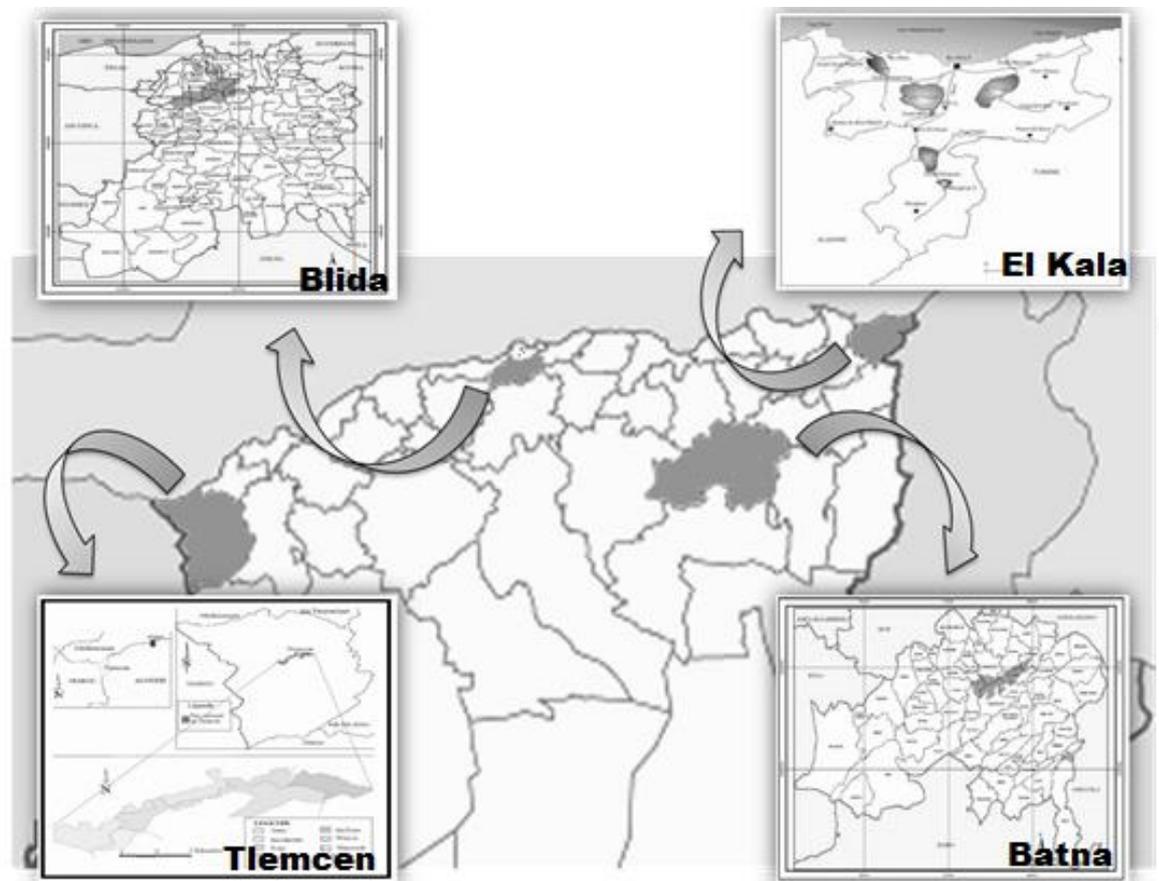


Figure 4.1 : Situation géographique des régions d'étude [99] ; [100] ; [101] ; [102]

4.1.1. Parc National d'El Kala (PNEK)

Le Parc National d'El-Kala délimite un territoire entièrement contenu dans la wilaya d'El Taref (Figure 4.1). Localisé à l'extrême Nord-Est algérien, il est limité à l'Est par la frontière Algéro-Tunisienne, au Nord par la mer Méditerranée, à l'Ouest par l'extrémité de la plaine alluviale d'Annaba et enfin au Sud par les contreforts des Monts de la Medjerda. Ses coordonnées géographiques sont 36°52 de latitude Nord et 8°27 de longitude. [99]

- **Présentation des stations d'étude**

Dans ce Parc, quatre stations ont été choisies afin de parcourir l'ensemble du territoire du Parc ; Ezana, qui se situe au Sud-Ouest de la ville d'El Kala, Ain El Hout au Sud de la station d'Ezana, Haddada, à l'extrême Nord-Est du parc, et enfin, Kser Fatima, au Sud-Est du parc (Figure 4.2). Il est à noter que ces deux dernières stations atteignent les frontières Algéro-Tunisiennes comme l'illustre la figure 4.3. 25 arbres de chêne liège ont été concernés par l'échantillonnage au sein du PNEK.



Figure 4.2 : Situation géographique des quatre stations d'étude au PNEK [99]

A. Ezana **B.** Haddada **C.** Ain El Hout **D.** Kser Fatima

Le tableau 4.1 résume les caractéristiques des stations choisies :

Tableau 4.1 : Quelques caractéristiques des stations d'études au PNEK

Station	Altitude	Exposition	Superficie	Nbr d'arbres échantillonnés	Espèce dominante
Ezana	180m	Nord	120ha	06	Chêne liège
Haddada	100m	Nord	500ha	08	Chêne liège
Ain El Hout	300m	Sud	400ha	06	Chêne liège
Kser Fatima	800m	Nord	1200ha	05	Chêne liège

4.1.2. Le Parc National de Chréa (PNC)

Le parc National de Chréa est situé au sommet de l'Atlas blidéen, à 50km au Sud-Ouest d'Alger ; il s'étend tout au long des parties centrales de la chaîne de l'Atlas tellien sur une superficie de 26 587 ha (Figure 4.3).

Le parc domine vers le Nord la plaine de la Mitidja et vers le Sud les hautes plaines du Titteri. Vers l'Ouest, le PNC s'étend aux montagnes du massif du Dahra et toute la terminaison orientale de l'Ouarsenis ainsi que le Mont du djebel Zaccar. Vers l'Est, on trouve la chaîne des Bibans suivie des hauteurs du Djurdjura [103].

- **Présentation des stations d'étude**

Un ensemble de 17 arbres (chêne vert et chêne liège) ont été concernés par l'échantillonnage au sein du PNC, répartis sur trois principales stations ; Ayoun : une forêt mixte au Sud de Chréa à 900m d'altitude, Gheley et la forêt noire à l'Ouest du village de Chréa (Figure 4.3).

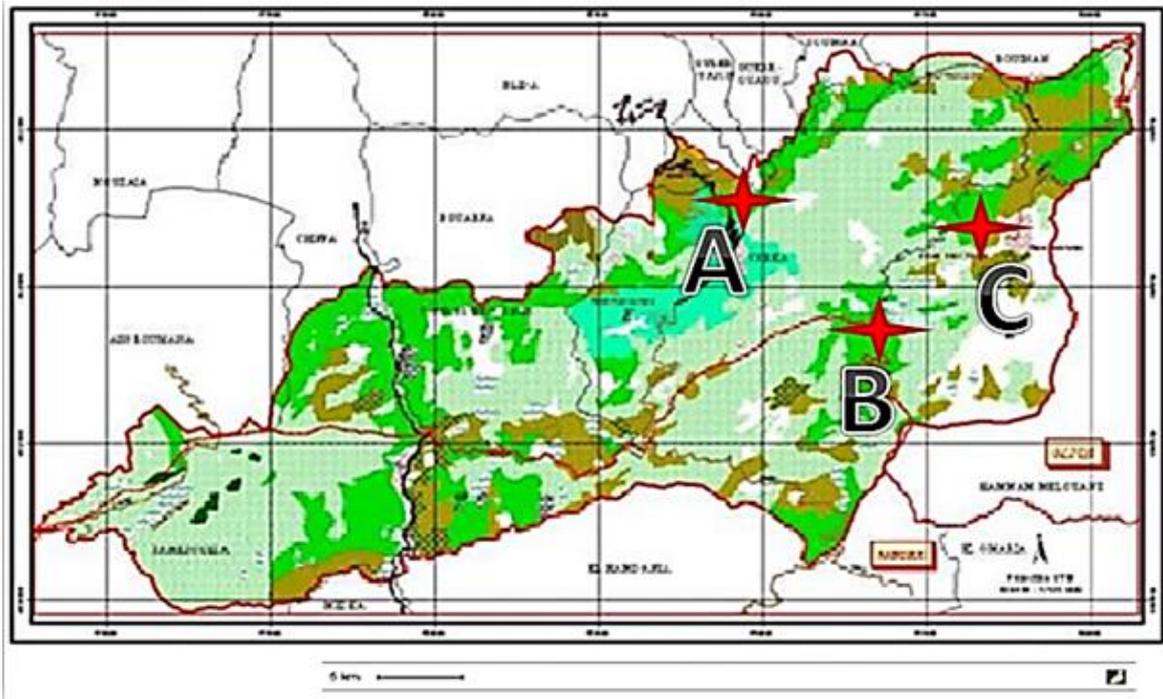


Figure 4.3: Situation géographique des trois stations au sein du PNC [100]
A. Ayoun **B.** Gheley **C.** Forêt noire

Les principales caractéristiques des différentes stations du PNC sont résumées dans le tableau 4.2:

Tableau 4.2 : Quelques caractéristiques des stations d'études au PNC

Station	Altitude	Exposition	Superficie	Nbr d'arbres échantillonnés	Espèce dominante
Ayoun	1450m	Sud	200ha	07	Chêne liège + Chêne vert
Gheley	900m	Nord	300ha	04	Chêne vert
La forêt noire	1450m	Sud	400ha	06	Cèdre de l'Atlas + Chêne vert

4.1.3. Parc National de Belezma (PNB)

Le massif de Bélezma se situe à 7 Km de la ville de Batna. Il est limité par la plaine de Mérouana et d'Aïn Djasser au Nord, la plaine d'El-Madher à l'Est, et à l'Ouest par l'Oued de Barika qui le sépare des Monts du Hodna (Figure 4.4) [104].

- **Présentation des stations d'études**

Pour le Parc National de Belezma, une seule station d'étude a été choisie, celle de Thouggar, située à l'Ouest de la ville de Batna et composée d'un mélange de chêne vert et du Cèdre de l'Atlas. (Figure 4.4)

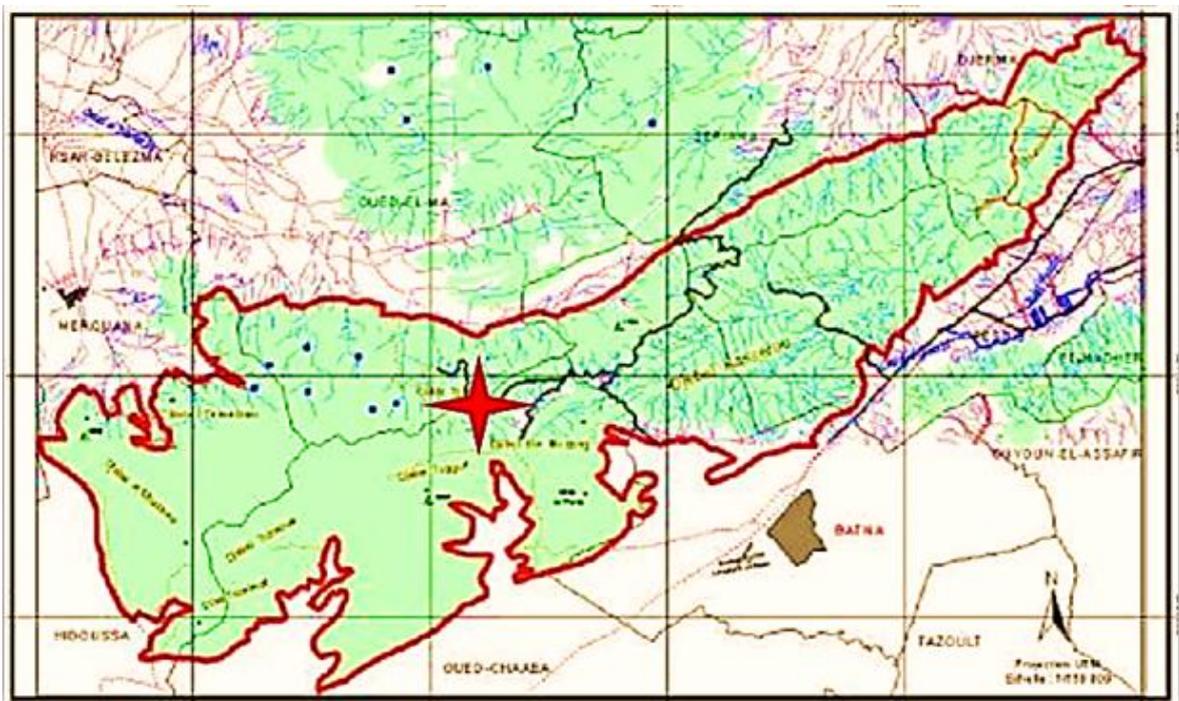


Figure 4.4 : Localisation de la station d'étude au sein du Parc de Belezma [101]

Le tableau 4.3 présente les principales caractéristiques de cette station :

Tableau 4.3 : Quelques caractéristiques des stations d'études au PNB

Station	Altitude	Exposition	Superficie	Nbr d'arbres échantillonnés	Espèce dominante
Thouggar	1400m	Nord	800ha	11	Cèdre de l'Atlas + Chêne vert

4.1.4. Parc national de Tlemcen (PNT)

Le parc national de Tlemcen se situe au nord-ouest de l'Algérie. C'est l'un des plus récents parcs nationaux d'Algérie ; il a été créé le 12 mai 1993 par le décret n°93/117 pour la conservation des faunes et des flores évoluant dans un microclimat humide [105].

- Présentation des stations d'études

Deux stations d'études ont été choisies au sein du PNT, à savoir la forêt domaniale de Zariffet et celle de Hafir à l'ouest du parc national (figure 4.5) où se trouvent des forêts de chêne vert, chêne liège et chêne Zeen en présence d'autres espèces forestières ; au total notre échantillonnage a porté sur 14 arbres.

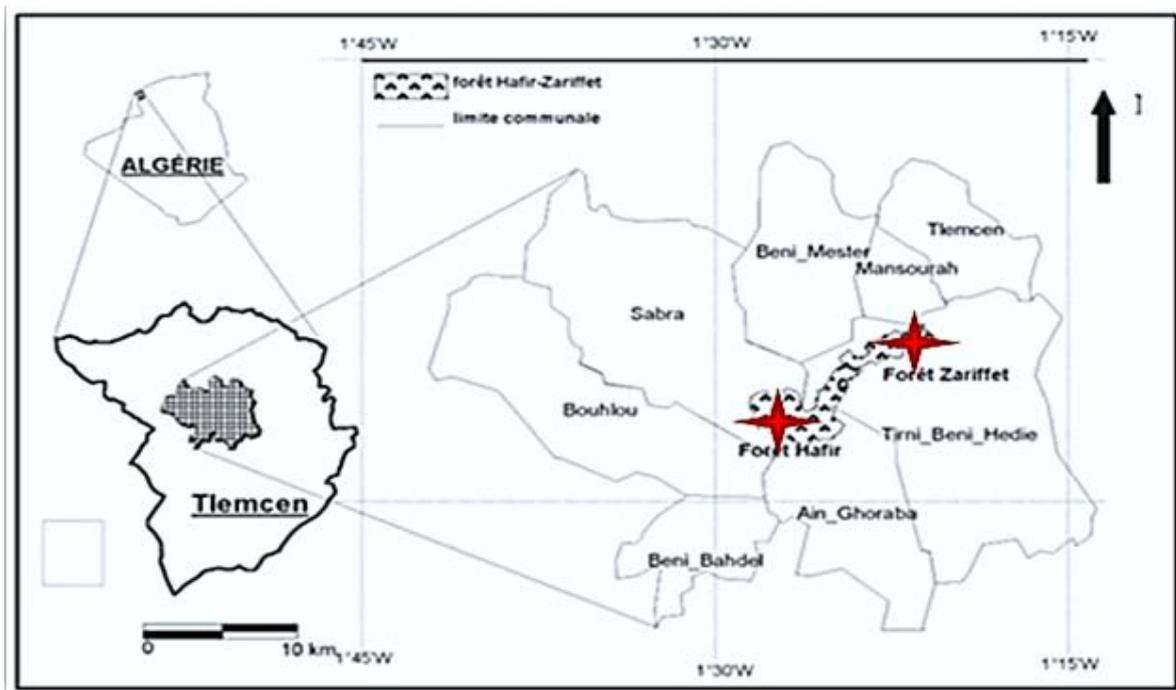


Figure 4.5 : Localisation des stations d'étude au PNT [102]

Le tableau 4.4 présente les principales caractéristiques de ces stations :

Tableau 4.4 : Quelques caractéristiques des stations d'études au PNT

Station	Altitude	Exposition	Superficie	Nbr d'arbres échantillonnés	Espèce dominante
Hafir	1200m	Nord	9872ha	07	Chêne liège + Chêne vert
Zariffet	1300m	Sud	962ha	07	Chêne liège + Chêne Zeen

4.2. Méthode d'échantillonnage

4.2.1. Sur terrain

Sur le terrain, nous avons procédé à un échantillonnage complètement aléatoire. A partir de 67 arbres de chêne présentant des symptômes de dépérissement (Figure 4.6), nous avons sectionné et regroupé par arbre des troncs, des branches, et de jeunes rameaux présentant des symptômes. Ainsi, pour chaque arbre nous avons mis un code qui comprend le numéro de l'arbre, la station ainsi que la région.



Figure 4.6 : Deux pieds de chêne liège présentant des symptômes de dépérissement

L'ensemble des échantillons prélevés à partir des quatre parcs ont été enveloppés dans du papier et mis au réfrigérateur.

Chaque partie de bois a été par la suite coupé avec une scie en rondelles à la recherche de différents types de nécroses (Figure 4.7). Ces rondelles ont été ensuite regroupées selon la couleur, la forme et la consistance de la nécrose puis coupées en buchettes de 0,5 à 1 cm de côté, comprenant une partie saine et une partie nécrosée du bois et mises dans de petites boites codées afin de connaître l'origine de chaque buchette.

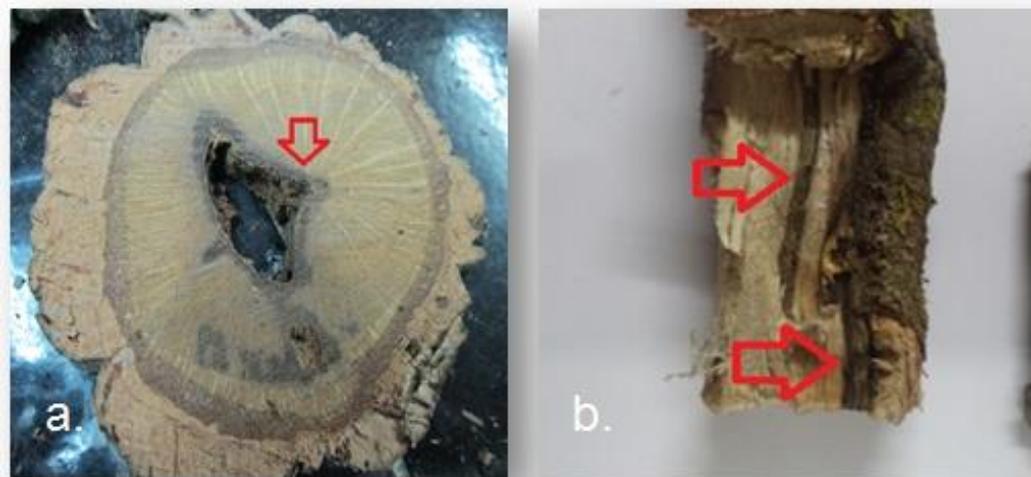


Figure 4.7 : Coupes transversale et horizontale d'une branche montrant la nécrose

4.2.2. Au laboratoire

4.2.2.1. Désinfection et isolement

Au lendemain de la préparation des buchettes, celles-ci ont été désinfectées avec une solution contenant de l'hypochlorite de Sodium à 8° Chlore pendant 10min dans un milieu stérile sous une hotte à flux laminaire puis rincés trois fois avec de l'eau distillée stérile selon la technique décrite par PEROS ET BERGER [106] et BERRAF ET PEROS [107]

Les buchettes ont subi des coupes de rafraichissement à l'aide d'un scalpel stérile sur du papier buvard stérile, puis mises par nombre de cinq dans des boites de Pétri contenant du milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Appendice B), fermée à la fin avec du para-film et mises en incubation à 25°C. (Figure 4.8.a)

4.2.2.2 Le suivi

L'observation et le contrôle des buchettes se faisaient chaque 24h à 48h et à chaque fois qu'une colonie se développe (figure 4.8.b), elle est repiquée sur un nouveau milieu PDA. Cette étape a duré plus de 3 mois, une période assez longue pour s'assurer d'avoir laissé le temps pour les champignons à croissance lente de se développer. Nous avons pu remarquer qu'une seule buchette pouvait donner plus de 3 champignons différents alors que d'autres restaient stériles.

4.2.2.3. Purification et conservation des isolats

La purification des isolats consiste à faire plusieurs repiquages jusqu'à l'obtention de cultures pures (figure 4.8.c), qui ont été conservées dans des Eppendorfs stériles et codés (figure 4.8.d). Ils ont été transférés par la suite au laboratoire de microbiologie de l'université Nova de Lisboa (Portugal) pour l'identification morphologique et moléculaire.

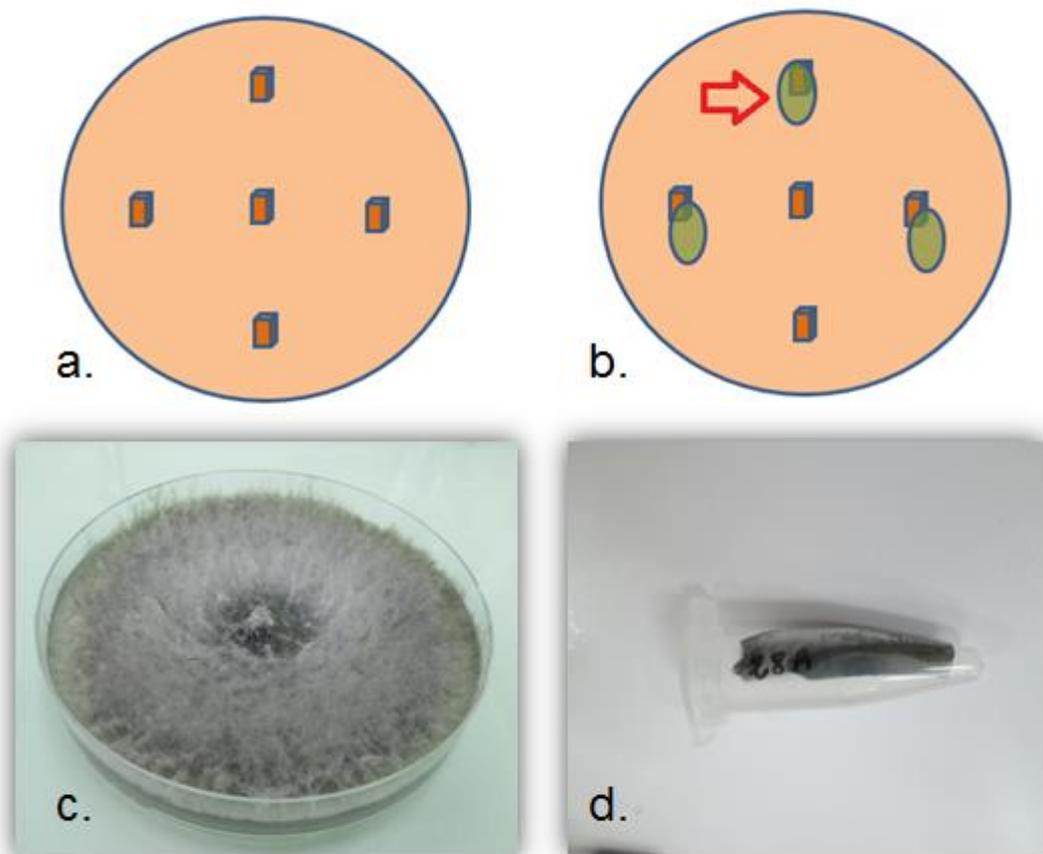


Figure 4.8 : Les différentes étapes d'isolement des champignons
a. isolement **b.** repiquage **c.** colonie pure **d.** Conservation

4.2.2.4. Identification des isolats

Pour l'identification de l'ensemble des isolats, nous avons suivi la méthodologie du Professeur A. Phillips au sein du laboratoire de microbiologie de l'université NOVA de LISBOA. D'abord l'ensemble des isolats est identifié sur la base des descripteurs phénotypiques (couleur, croissance mycélienne... etc.) grâce aux caractères morphologiques des différents genres (Tableau 4.5)

Tableau 4.5 : critère d'identification des différents genres

Agents fongiques	Caractéristiques morphologies	Références
<i>Botryosphaeriaceae</i>	se caractérisent par un mycélium aérien à croissance rapide, d'une couleur blanche qui devient grise à verte foncée sur PDA. les cultures peuvent montrer des pycnides solitaires ou groupés, de couleur noire. Différents types de conidies sont observées. Elles peuvent être hyalines ou pigmentées et cloisonnées ou aseptées permettant de différencier entre les genres.	[83] ; [108]
<i>Biscogniauxia</i>	Les colonies sur PDA ont une pigmentation jaune frappante, elles ont atteint les bords de la boîte de Petri dans une semaine à une température ambiante avec l'alternance de la lumière et d'. Les colonies sporulent vigoureusement sur PDA	[109]
<i>Cytospora</i>	Une large gamme de variation des caractéristiques culturelles dans ces taxons. Les isolats peuvent être à l'origine de couleur blanche, puis jaune-vert après 5-6 jours et enfin devenir jaune-brun ou être de couleur brun foncé ou blanc persistant, blanc laiteux ou gris. Les colonies sont plates, feutre, et de texture cartilagineuse ou texture de cuir.	[110]

Les isolats appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae* ont été sélectionnés pour l'identification moléculaire et micro-morphologique.

4.2.2.5. Identification moléculaire

L'identification moléculaire des différents agents fongiques s'est déroulée sur plusieurs étapes (figure 4.9), d'abord l'ensemble des isolats ont été cultivés sur milieu PDA, après purification, une copie de ces isolats a été destinée pour l'identification moléculaire, une deuxième pour la caractérisation morphologique et une dernière a été conservé à 4°C.

4.2.2.5.1. Matériel génomique

L'ADN de l'ensemble des isolats des *Botryosphaeriaceae* est extrait à partir du mycélium en phase de croissance, âgé d'environ quatre à sept jours ; l'obtention du mycélium est faite par grattage à la surface de la gélose à l'aide d'un scalpel stérile devant une flamme de bec benzène.

- **Extraction d'ADN**

L'extraction d'ADN a été réalisée selon la méthode décrite par SANTOS ET PHILLIPS [111] ET BERRAF [112]. Le protocole est le suivant :

- Mettre le mycélium dans des Eppendorf de 2ml
- Ajouter environ 50µl de microsphère en verre autoclavée
- Ajouter 1,5ml d'eau stérile
- Mettre à -20°C pendant quelques heures à une nuit
- Centrifuger à 13000rpm pendant 5min à 4°C
- Enlever l'eau du tube avec une micropipette
- Transférer les Eppendorf dans la glace
- Ajouter 250µl de Phénol, 250µl de Chloroforme et 500µl de tampon de lyse
- Vortexer pendant 20min
- Centrifuger à 14500rpm pendant 25min à 4°C
- Transférer la phase aqueuse dans un Eppendorf de 1,5ml
- Ajouter un volume égal d'isopropanol glacé (environ 500µl)

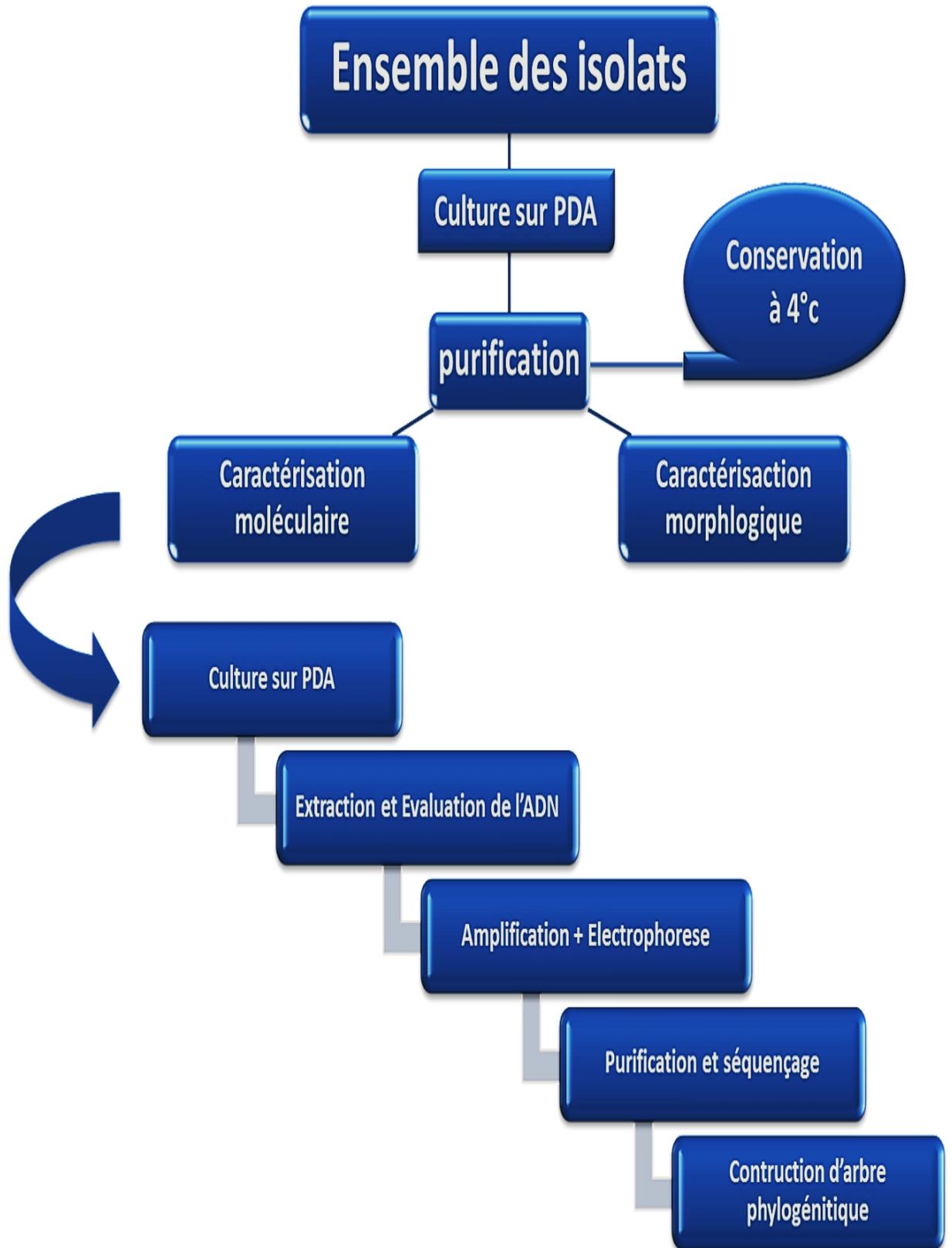


Figure 4.9: schéma des étapes de la caractérisation moléculaire

- Retourner doucement plusieurs fois
- Centrifuger à 14500rpm pendant 10min à 4°C
- Eliminer le surnageant
- Rincer le culot d'ADN avec 1ml d'éthanol glacé à 70%
- Centrifuger à 14500rpm pendant 5min à 4°C
- Eliminer le surnageant
- Laisser le culot d'ADN sécher à une température ambiante pendant 5 à 10min
- Suspending l'ADN dans 50µl de TE + RNase
- Incuber pendant 15min à 55°C
- Calculer la quantité d'ADN (la concentration)
- Diluer dans 50µl d'eau à une concentration de 60 nano-gramme
- Conserver à -20°C

- **Evaluation quantitative et qualitative de l'ADN**

Cette procédure consiste à évaluer la quantité d'ADN extraite en mesurant la DO (densité optique) à 260nm au spectrophotomètre du type NanoDrop ND-1000 [164]. Une autre mesure de DO a été prise à 280 nm, afin de déterminer la pureté de l'ADN, ainsi le rapport entre la DO₂₆₀ / DO₂₈₀ (donné par le logiciel) constitue un moyen évaluatif permettant d'apprécier la qualité de l'ADN. Ce dernier est considéré pur lorsque le rapport est compris entre 1,8 et 2 [112].

4.2.2.5.2. Amplification de l'ADN

- **Amorces utilisées**

Plusieurs amorces ont été utilisées tout au long de notre expérimentation (Tableau 4.6). Il est à noter que toutes les réactions PCR ont été réalisées avec la Taq polymérase, des nucléotides et des tampons fournies par MBI (Vilnius, Lituanie), tandis que les amorces ont été fournies par la société STAB Vida, Lda (Oeiras, Portugal).

Tableau 4.6 : Les différentes amorces utilisées

Région / gène	Amorces	Séquence nucléotidique (5'-3')	Taille des fragments	réf
ITS (Internal-Transcribed Spacer)	ITS 1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	600 pb	[111]
	ITS 4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	600 pb	[111]
Facteur d'élongation EF-1 α	EF1-728F	CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG	300 pb	[113]
	EF1-986R	TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC	300 pb	[113]

- **Amplification de la région ITS (*Internal Transcribed Spacer*)**

L'amplification est faite dans un volume final de 50 μ l contenant 1 μ l d'ADN (50-100ng) et 49 μ l de mix (Tableau 4.7), selon les conditions décrites au tableau 4.8, des témoins contenant de l'eau stérile à la place de l'ADN ont été utilisés dans chaque réaction PCR. Les amorces oligonucléotidiques ITS1 et ITS4 [114] sont utilisées tel que décrit par ALVES ET AL [115].

Tableau 4.7 : Composition du mix de l'amplification [112]

Réactifs	Concentration	Volume par tube (μ l)
Tampon (Taq Buffer)	10X	5
dNTPs	1,25mM	8
MgCl₂	25mM	2
DMSO (Dimethylsulfoxide)		2,5
Amorce (Forward)	10 μ M	2
Amorce (Reverse)	10 μ M	2
Taq polymérase	5U/ μ l	0,40
ADN	(50-100 ng)	1
H₂O ultra pure (Gibco)	-	27,10
TOTAL	-	50

Tableau 4.8: Les conditions d'amplification des ITS [112]

	PCR Program		
	Température °c	Temps	
Pré-dénaturation	95	5min] X 34
Dénaturation	95	30s	
Amplification	50	30s	
Elongation	72	2min	
Elongation finale	72	7min	
Fin	4	pause	

- **Amplification du gène du facteur d'élongation de traduction (EF1- α)**

Le mix destiné à cette opération est exactement le même que celui utilisé pour l'amplification des ITS. Dans ce cas, les amorces EF1-728F et EF1-986R [113] sont utilisées sous les conditions mentionnées au tableau 4.9, tel que décrit par PHILLIPS ET AL. [83].

Tableau 4.9: Les conditions d'amplification du gène d'élongation [112]

	PCR Program		
	Température °c	Temps	
Pré-dénaturation	95	7min] X 34
Dénaturation	95	1min	
Amplification	50	1min	
Elongation	72	1min	
Elongation finale	72	10min	
Fin	4	pause	

- **L'électrophorèse**

Après l'amplification des ITS et EF1- α , 5 μ l de chaque produit de PCR sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose (Gibco, BRL) à 1% dans un tampon TAE (1 x) (40mM de Tris, 40mM d'acétate, 1mM d'EDTA, pH 8), contenant du GEL RED (2 μ l/80 ml de gel) pendant 45min à 80v.

La taille des fragments d'ADN générés est déterminée par comparaison avec la gamme de concentration d'ADN standard du marqueur de taille moléculaire (GeneRuler – DNA Ladder) déposé à raison de 6 μ l par puits sur les deux côtés de chaque gel. Les bandes amplifiées sont alors visualisées sous éclairage UV avec « Molecular Imager Gel Doc XR System » (Bio-Rad, Hercules, California, USA) [112].

- **Purification de l'ADN et séquençage**

Le kit commercial de purification Spin Nucleo Extract II (Macherey-Nagel, Duren, Germany) a été utilisé (selon les instructions du fabricant) pour purifier les séquences amplifiées par PCR. L'ensemble des produits de PCR ont été séquencés par la société STAB Vida, Lda (Oreiras, Portugal).

4.2.2.6. Analyses phylogénétiques

4.2.2.6.1. Traitement des séquences

Les séquences complètes de la région ITS et les fragments des gènes EF1- α sont lus et édités. Une séquence consensus est faite à partir des séquences sens « forward » et anti-sens « reverse » en utilisant l'éditeur d'alignement de séquences BioEdit Version 7.0.9.0 [116]. En se basant sur les chromatogrammes fournis, l'ensemble des séquences ont été vérifiées manuellement et des arrangements de nucléotides à des positions douteuses ont été clarifiés.

Des séquences de référence déposées dans la banque publique GenBank (NCBI : The National Center for Biotechnology Information) ayant le plus de similarité aux espèces obtenues dans cette étude ont été trouvées par un alignement utilisant l'algorithme BLASTn (Basic local alignment search tool) [117] (Tableau 4.10). Aussi, des séquences de références représentant les espèces les plus pertinentes pour les *Botryosphaeriaceae* [74] ; [81]; [112];[118] ont été ajoutées à l'analyse (Tableau 4.10) afin de pouvoir positionner les espèces nouvellement découvertes parmi celles déjà décrites.

4.2.2.6.2. Alignement des séquences

L'alignement des séquences est établi par le logiciel ClustalX 1.83 [173]. En plus, des modifications manuelles ont été réalisées si cela était nécessaire. Il a été montré que la qualité de l'alignement pouvait avoir un impact sur l'arbre final plus que la méthode de construction employée [119].

4.2.2.6.3. Construction des arbres phylogénétiques

Des séquences nucléotidiques des ITS et des gènes de facteur d'élongation nous ont permis de construire les arbres phylogénétiques. Les analyses phylogénétiques des données de séquences ont été réalisées en utilisant le programme PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) vers. 4.0b10 [120].

Deux méthodes de reconstruction d'arbres phylogénétiques ont été appliquées en parallèle, la méthode du Neighbour-Joining (NJ) (méthode du plus proche voisin basée sur la ressemblance globale entre les séquences) et la méthode de maximum de parcimonie (MP) (méthode basée sur les caractères). [108] ;[112] ;[121] ;[122] ;[123].

Les arbres sont construits en maximum de parcimonie (MP) et identifiés par recherche heuristique qui permettra de rechercher un arbre s'approchant de l'optimal, en utilisant la méthode Tree-Bisection-Reconnection (TBR) de l'algorithme de réarrangement des branches (branch swapping). D'autres mesures ont été utilisées, l'indice de cohérence (IC), l'indice de rétention (RI) et l'indice d'homoplasie (HI) ; les trous (gaps) étant traités comme des données manquantes. La robustesse des topologies (des nœuds) de MP est estimée par les procédures de "bootstrap" en utilisant 1000 répétitions (full heuristic search) [124]. La construction de ces arbres phylogénétiques est réalisée contre un groupe externe (outgroup) [112].

4.2.2.6.4. Analyses simultanées des séquences

L'analyse simultanée permet non seulement de mieux révéler les conflits entre données, mais aussi de tirer profit de la combinaison synergique de certains caractères, à savoir le renforcement de la robustesse de certains nœuds de l'arbre phylogénétique qui n'étaient pas ou peu soutenus par les analyses séparées.

Toutefois, il s'avère davantage instructif d'unir les résultats de séquençage de plus d'un gène [112] ; [125] ; [126]. La possibilité de combiner l'ensemble des données des ITS et l'EF1- α a été évaluée en comparant les clades fortement soutenus parmi les arbres générés des analyses séparées.

Tableau 4.10 : numéro d'accèsion à Genbank et données des espèces de *Botryosphaeriaceae* utilisées pour la reconstruction des arbres phylogénétiques

ESPECE	NUMERO D'ISOLAT	ORIGINE	PLANTE HOTE	NUMERO D'ACCESION A GENBANK	
				ITS	EF1- α
<i>Bothryosphaeria dothidea</i>	CBS 110302	Portugal	<i>Vitis vinifera</i>	AY259092	AY573218
<i>Bothryosphaeria dothidea</i>	CBS 115476	Switzerland	<i>Prunus sp.</i>	AY236949	AY236898
<i>B. agaves</i>	MFLUCC100051			JX646790	JX646855
<i>B. agaves</i>	MFLUCC110125			JX646791	JX646856
<i>B. corticis</i>	ATCC22927	North Carolina, USA	<i>Vaccinium sp</i>	DQ299247	EU673291
<i>B. corticis</i>	CBS 119047	USA	<i>Vaccinium corymbosum</i>	DQ299245	EU017539
<i>B. fabicernianum</i>	CMM 3899	Brazil		JX513646	JX513625
<i>B. fabicernianum</i>	CMW 27094	China		HQ332197	HQ332213
<i>B. ramosum</i>	CBS 122069	Bell Gorge, WA	<i>E. camaldulensis</i>	EU144055	EU144070
<i>B. scharifii</i>	CBS 124703	Iran	<i>M. indica</i>	JQ772020	JQ772057
<i>B. scharifii</i>	CBS 124702	Iran	<i>M. indica</i>	JQ772019	JQ772056
<i>Diplodia corticola</i>	CBS 112547	Spain	<i>Quercus ilex</i>	AY259110	DQ458872
<i>Diplodia corticola</i>	CBS 112549	Portugal	<i>Quercus suber</i>	AY259100	AY573227
<i>D. africana</i>	CBS 120835	Western Cape, South Africa	<i>Prunus persica</i>	EF445343	EF445382
<i>D. africana</i>	CBS 121104	Western Cape, South Africa	<i>Prunus persica</i>	EF445344	EF445383
<i>D. africana</i>	CBS 120835	South Africa	<i>Prunus persica</i>	EF445343	EF445382
<i>D. africana</i>	CBS 121104	South Africa	<i>Prunus persica</i>	EF445344	EF445383
<i>D. alatafructa</i>	CBS 124933	South Africa	<i>Pterocarpus angolensis</i>	FJ888478	FJ888446
<i>D. alatafructa</i>	CBS 124931	South Africa	<i>Pterocarpus angolensis</i>	FJ888460	FJ888444
<i>D. allocellula</i>	CMW 36469	Pretoria, South Africa		JQ239398	JQ239385
<i>D. allocellula</i>	CMW 36470	Pretoria, South Africa		JQ239399	JQ239386
<i>D. bulgarica</i>	CBS 124135	Plovdiv, Bulgaria	<i>Malus sylvestris</i>	GQ923852	GQ923820
<i>D. bulgarica</i>	CBS 124254	Plovdiv, Bulgaria	<i>Malus sylvestris</i>	GQ923853	GQ923821
<i>D. cupressi</i>	CBS 168.87		<i>Cupressus sempervirens</i>	DQ458893	DQ458879
<i>D. cupressi</i>	CBS 261.85		<i>Cupressus sempervirens</i>	DQ458894	DQ458879
<i>D. intermedia</i>	CBS 124134	Torres Vedras, Portugal	<i>Cydonia sp</i>	HM036528	GQ923851
<i>D. intermedia</i>	CBS 124462	Setubal, Portugal	<i>Malus sylvestris</i>	GQ923858	GQ923826

Tableau 4.10 (suite): numéro d'accèsion à Genbank et données des espèces de *Botryosphaeriaceae* utilisées pour la reconstruction des arbres phylogénétiques

ESPECE	NUMERO D'ISOLAT	ORIGINE	PLANTE HOTE	NUMERO D'ACCESION A GENBANK	
				ITS	EF1- α
<i>Diplodia malorum</i>	CBS 124130	Setubal, Portugal	Malus sylvestris	GQ923865	GQ923833
<i>D. malorum</i>	CBS 112554	Portugal	Malus sylvestris	GQ923860	GQ923828
<i>D. mutila</i>	CBS 112553	Portugal	Vitis vinifera	AY259093	
<i>D. mutila</i>	CBS 230.30	USA	Poenix dactylifera	DQ458886	DQ458869
<i>D. olivarum</i>	CBS 121886	Puglia, Italy	Olea europaea	EU392301	EU392278
<i>D. olivarum</i>	CBS 121887	Puglia, Italy	Olea europaea	EU392302	EU392279
<i>D. pinea</i>	CBS 109725	South Africa	Pinus patula	DQ458896	DQ458881
<i>D. pinea</i>	CBS 393.84	Netherlands	Pinus negra	DQ458895	DQ458880
<i>D. pseudoseriata</i>	CBS 124907	Uruguay	Hexachlamis edulis	EU080922	EU863179
<i>D. pseudoseriata</i>	CBS 124906	Uruguay	Blepharocalyx salicifolius	EU080927	EU863181
<i>D. quercivora</i>	CBS 133852	Tabarka, Tunisia	Quercus canariensis	JX894205	JX894229
<i>D. quercivora</i>	CBS 133853	Tabarka, Tunisia	Quercus canariensis	JX894206	JX894230
<i>D. rosulata</i>	CBS 116470	Ethiopia	Prunus africana	EU430465	EU430267
<i>D. rosulata</i>	CBS 116472	Ethiopia	Prunus africana	EU430266	EU430268
<i>D. scrobiculata</i>	CBS 118110			KF766160	DQ458885
<i>D. scrobiculata</i>	CBS 109944	Mexico	Pinus greggii	DQ458899	DQ458884
<i>D. seriata</i>	CBS 112555	Portugal	Vitis vinifera	AY590094	AY573220
<i>D. seriata</i>	CBS 119049	Italy	Vitis sp.	DQ458889	DQ458874
<i>D. tsugae</i>	CBS 418.64	Canada	Tsuga heterophylla	DQ458888	DQ458873
<i>D. vinea-gemmae</i>	DAR81012	Australia, Pokolbin	V. vinifera	KJ573644	KJ573641
<i>Dothiorella iberica</i>	CMW25752	Slovenia, Križ	Juniperus comunis	FM95583	FM955415
<i>Dothiorella parva</i>	CMW25753	Slovenia, Podgorje	Ostrya carpinifolia	FM955391	FM955423
<i>Do. brevicollis</i>	CMW36463	South Africa, Pretoria	A. karroo	JQ239403	JQ239390
<i>Do. capri-amissi</i>	CBS121763	South Africa, Northern Cape Province	Acacia erioloba	EU101323	EU101368
<i>Do. iberica</i>	CAA005	USA	Pistacia vera	EU673312	EU673279
<i>Do. iberica</i>	CBS115041	Spain, Aragon	Quercus ilex	AY573202	AY573222
<i>Do. juglandis</i>	CBS188.87	Spain, Sant Esteve Sesrovires	V. vinifera	AY905558	AY905561
<i>Do. longicollis</i>	CBS122068	Western Australia,	Lysiphillum cunninghamii	EU144054	EU144069
<i>Do. moneti</i>	MUCC506	Western Australia	Allocasuarina rostellifera	EF591921	EF591972
<i>Do. oblonga</i>	CBS121765	South Africa, Pretoria	Acacia mellifera	EU101300	EU101345
<i>Do. parva</i>	JL599	Spain	C. avellana	EU673314	EU673281

Tableau 4.10 (suite): numéro d'accèsion à Genbank et données des espèces de *Botryosphaeriaceae* utilisées pour la reconstruction des arbres phylogénétiques

ESPECE	NUMERO D'ISOLAT	ORIGINE	PLANTE HOTE	NUMERO D'ACCESION A GENBANK	
				ITS	EF1- α
<i>Dothiorella parva</i>	CMW26362	Slovenia, Podgorje	<i>O. carpinifolia</i>	FM955390	FM955422
<i>Do. parva</i>	CMW25751	Slovenia, Gorjansko	<i>Cotinus coggygria</i>	FM955384	FM955416
<i>Do. parva</i>	CMW25750	Italy, S. Michele	<i>O. carpinifolia</i>	FM955385	FM955417
<i>Do. pretoriensis</i>	CMW36480	South Africa, Pretoria	<i>Acacia karroo</i>	JQ239405	JQ239392
<i>Do. santali</i>	MUCC509	Western Australia	<i>A. rostellifera</i>	EF591924	EF591975
<i>Do. sarmentorum</i>	CBS 115038	Netherlands	<i>Malus pumila</i>	AY573296	AY573223
<i>Do. sarmentorum</i>	IMI63581b	England	<i>Ulmus</i> sp.	AY573212	AY573235
<i>Do. Symphoricarposicola</i>	MFLUCC130497	Italy	<i>Symphoricarpos</i> sp.	KJ742378	KJ742381
<i>Do. Symphoricarposicola</i>	MFLUCC130498	Italy	<i>Symphoricarpos</i> sp.	KJ742379	KJ742382
<i>Do. thripsita</i>	BRIP51876	Australia, Tallegalla	<i>Acacia harpophylla</i>	KJ573642	KJ573639
<i>Dothiorella</i> sp.	CMW25743	Italy, Lochere	<i>O. carpinifolia</i>	FM955386	FM955418
<i>Dothiorella</i> sp.	CMW 25743	Lochere, Italy	<i>O. carpinifolia</i>	FM955386	FM955418
<i>L. theobromae</i>	CBS 287.47	Unknown	<i>Musa sapientum</i>	EF622069	EF622049
<i>L. theobromae</i>	CBS 289.56	New Guinea	Sail-cloch	EF622070	EF622050
<i>Neofusicoccum parvum</i>	CBS 110301	Portugal	<i>Vitis vinifera</i>	AY259098	AY573221
<i>Neofusicoccum parvum</i>	CMW 9081	New Zealand	<i>Populus nigra</i>	AY236943	AY236888

4.2.2.6.5. Visualisation des arbres phylogénétiques

Les données ont été visualisées avec le logiciel TreeView [127]. Seuls les arbres issus de la méthode MP sont visualisés dans ce manuscrit et les nœuds communs aux deux méthodes sont indiqués par un astérisque. Seuls les bootstraps d'une valeur supérieure à 50% sont indiqués dans les arbres [112].

4.2.2.7. Caractérisation morphologique et culturelle des isolats

4.2.2.7.1. Caractères cultureux et aspect morphologique des colonies

L'ensemble des espèces de la famille des *Botryosphaeriaceae*, ont été cultivées sur le milieu PDA à 25°C, les caractères sélectionnés pour déterminer l'aspect culturel des thalles et la morphologie des cultures sont : l'aspect général du mycélium aérien, sa couleur, le caractère régulier ou non de la marge des colonies ainsi que la présence de pigment dans le milieu de culture [128].

4.2.2.7.2. Induction de la sporulation sur les brindilles de peuplier

L'étude morpho-taxonomique s'est déroulée au sein du laboratoire de microbiologie de l'université Nova de Lisbonne, dans le but de décrire la morphologie des conidiophores, ainsi que les dimensions, la forme, la pigmentation et le cloisonnement des conidies.

La sporulation a été réalisée sur des brindilles de peuplier (Figure 4.10) doublement autoclavées qui sont mises dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée à 2%. Les boîtes sont incubées à 25°C sous une photopériode de 8 heures pendant 2 à 3 semaines.

Les agents fongiques vont, par manque d'éléments nutritifs, sporuler et développer des pycnides qui ont été disséquée horizontalement et leur contenu est transféré sur une lame contenant une goutte d'eau stérile puis nous avons appliqué une goutte d'acide lactique à 100% après l'évaporation de l'eau. L'ensemble est couvert par une lamelle et visualisé sous un microscope Leica DMR HC muni d'un appareil à photo Leica DFC 320 .



Figure 4.10 : Induction de la sporulation sur les brindilles de peuplier.

4.2.2.8. Le test de pathogénicité

Le protocole, décrit par CARLUCCI ET AL. [129], a été appliqué pour réaliser le test de pathogénicité. Deux isolats de *Diplodia corticola* (20G et 24B) et deux isolats de *B. dothidea* (58C et 49A) ont été inclus dans les tests de pathogénicité ; ces derniers ont été réalisés en Janvier 2015 sur 48 boutures vertes de chêne liège et chêne vert (de 20 à 40 cm de long et 0,5 à 1,5 de diamètre) récoltées au Parc national de Chréa dans la même période.

Les boutures ont été désinfectées avec de l'éthanol à 70% et des blessures sont réalisées entre deux nœuds à l'aide d'une perceuse stérile (Figure 4.11 a). Ces dernières sont inoculées par des disques mycéliens des isolats utilisés (0,5 cm de diamètre) ; chaque expérience comprenait cinq répétitions.

Après l'inoculation, les blessures ont été enveloppées avec du coton stérile humide et scellées avec du parafilm (Figure 4.11 b) ; une extrémité de l'ensemble des branches a été mise dans de l'eau (afin d'éviter le dessèchement) et l'autre a été aussi fermée à l'aide du parafilm ; des contrôles ont été inoculés avec des bouchons de gélose stériles,

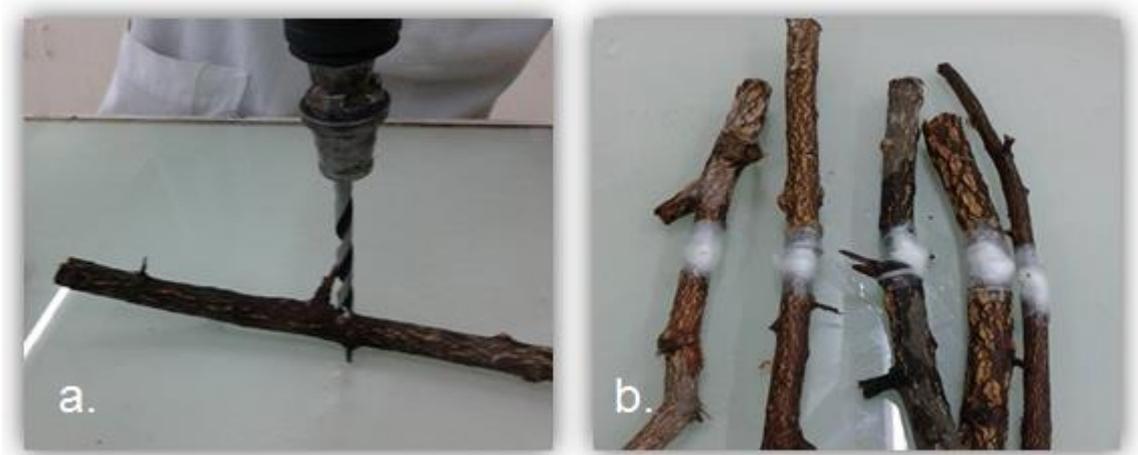


Figure 4.11 : L'inoculation du bois.

Les branches ont été examinées 30 jours après l'inoculation ; la longueur et la largeur de la décoloration du bois (nécrose) ont été mesurées ; les moyennes et les longueurs maximales et minimales ont été déterminées.

Des isolements à partir de ces boutures ont été réalisés et les champignons ont été cultivés sur du milieu PDA afin de répondre aux postulats de Koch.

CHAPITRE 5

RESULTATS ET DISCUSSION

5.1. Symptômes du dépérissement chez le chêne vert et le chêne liège

5.1.1. Symptômes externes

Dans notre expérimentation, nous avons constaté plusieurs symptômes de dépérissement sur les parties aériennes des deux espèces de chêne étudiées. Ces symptômes ont constitué un élément fondamental dans le choix des branches à prélever et des pieds à couper.

Le chêne vert : Le dépérissement étant moins accentué que celui observé chez le chêne liège, nous avons remarqué un rabougrissement de la végétation accompagné d'un dessèchement des rameaux terminaux et latéraux (Figure 5.1) ; cependant, dans des cas moins sévères, les symptômes se limitent uniquement aux jaunissements du feuillage.

Il est à signaler que nous avons remarqué, lors de notre expérimentation, la présence de petites fructifications noires sur l'écorce et/ou branches des deux essences étudiées sur les différents sites d'expérimentation.



Figure 5.1: Symptômes de dépérissement chez le chêne vert.

Chêne liège : le dépérissement débute par une défoliation des rameaux suivie par un dessèchement partiel ou total (Figure 5.2). Toutefois nous remarquons certains rameaux à infection moins sévère présentant un jaunissement total du feuillage. Dans certains cas où le dépérissement de l'arbre est sévère, nous constatons un jaunissement brutal et rapide, pouvant même mener à la disparition des chênes sur de larges superficies, ainsi que leur remplacement par d'autres végétations inexistantes auparavant. L'ensemble de ces symptômes a été observé sur des arbres de différents âges, à différentes fréquences et ceci, dans l'ensemble des parcs nationaux.



Figure 5.2: Symptômes de dépérissement chez le chêne liège
a. Défoliation, **b.** disparition de chêne, **c.** dessèchement total, **d.** jaunissement

5.1.2. Symptômes internes du bois

Lors de notre expérimentation sur le terrain, les coupes réalisées sur les troncs et les branches des chênes étudiés (67 arbres de chêne liège et de chêne vert), ont révélé la présence de plusieurs types de nécroses (Figure 5.3):

- a) Nécrose NCSD: Nécrose claire et dure en position sectorielle.
- b) Nécrose NCCD: Nécrose claire et dure en position centrale. Ce type de nécrose est trouvé le plus souvent chez le chêne vert ; il est généralement accompagné d'autres nécroses plus foncées.
- c) Nécrose NBCD : Nécrose caractérisée par la présence d'une zone brune et dure en position centrale, entourée par le bois sain qui contient parfois des points de couleur noire.
- d) Nécrose NBSD : Nécrose caractérisée par la présence d'une zone brune et dure en position sectorielle.
- e) Nécrose NCST : Nécrose claire et tendre en position centrale.
- f) PBD (Ponctuations noires) : Ponctuations de couleur noire, éparpillées dans le bois sain autour des nécroses.

Sur une même coupe transversale, une même branche ou un même tronc, plusieurs types de nécroses peuvent être présents.

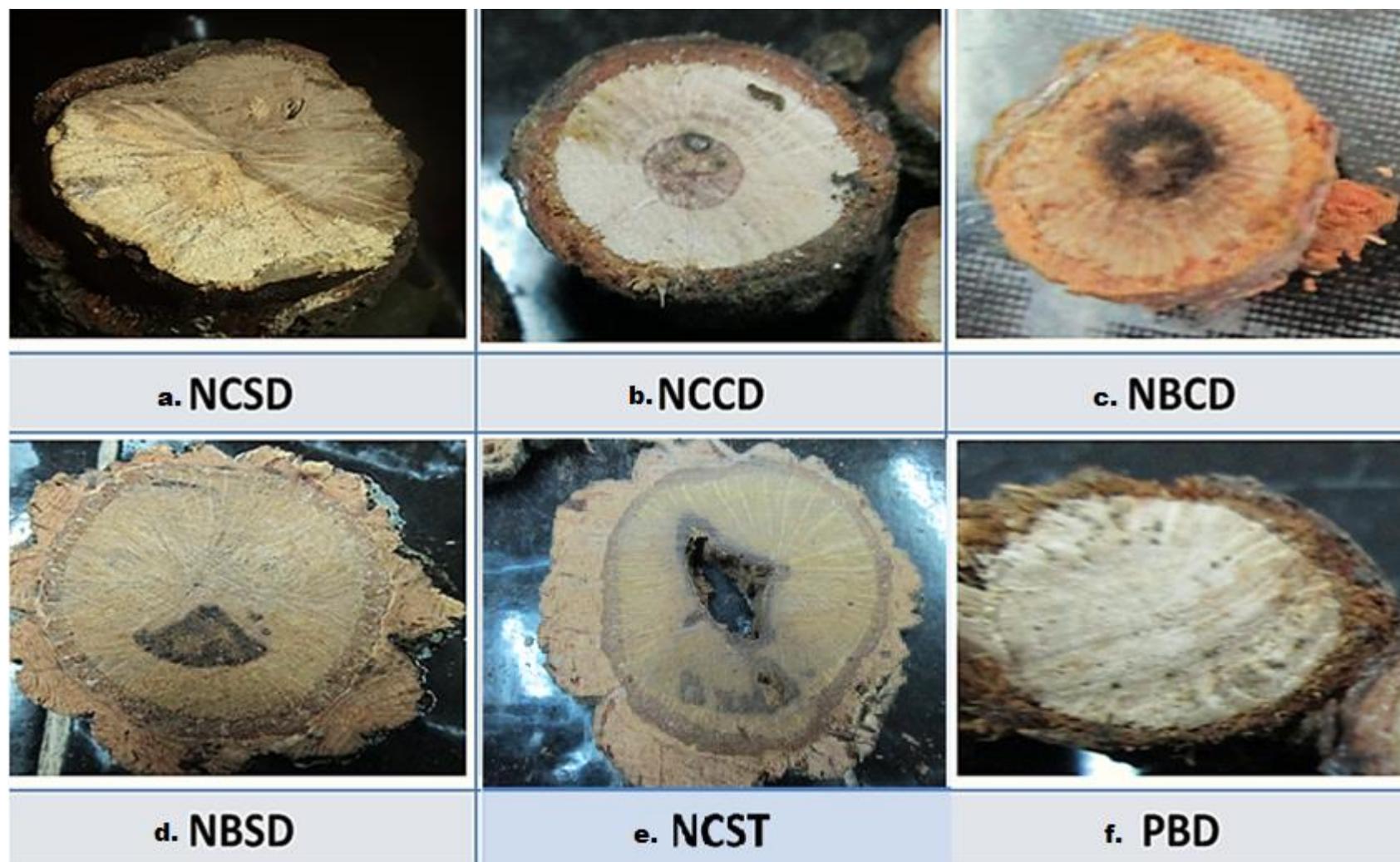


Figure 5.3: Coupes horizontales montrant les différents types de nécroses (Personnel 2014)

5.1.2.1. Taux de présences des différents types de nécroses dans les quatre régions

Tous les types de nécroses ont été observés à des taux différents (Figure 5.4). Les nécroses les plus abondantes et les plus rencontrées au sein des quatre régions d'étude sont celles de type NBSD (33%), NBCD (25%) et PBD (22%), la nécrose de type NCCD se place en 4eme position avec un taux de 11%, suivie par les nécroses de type NCSD (6%) et NCST (3%).

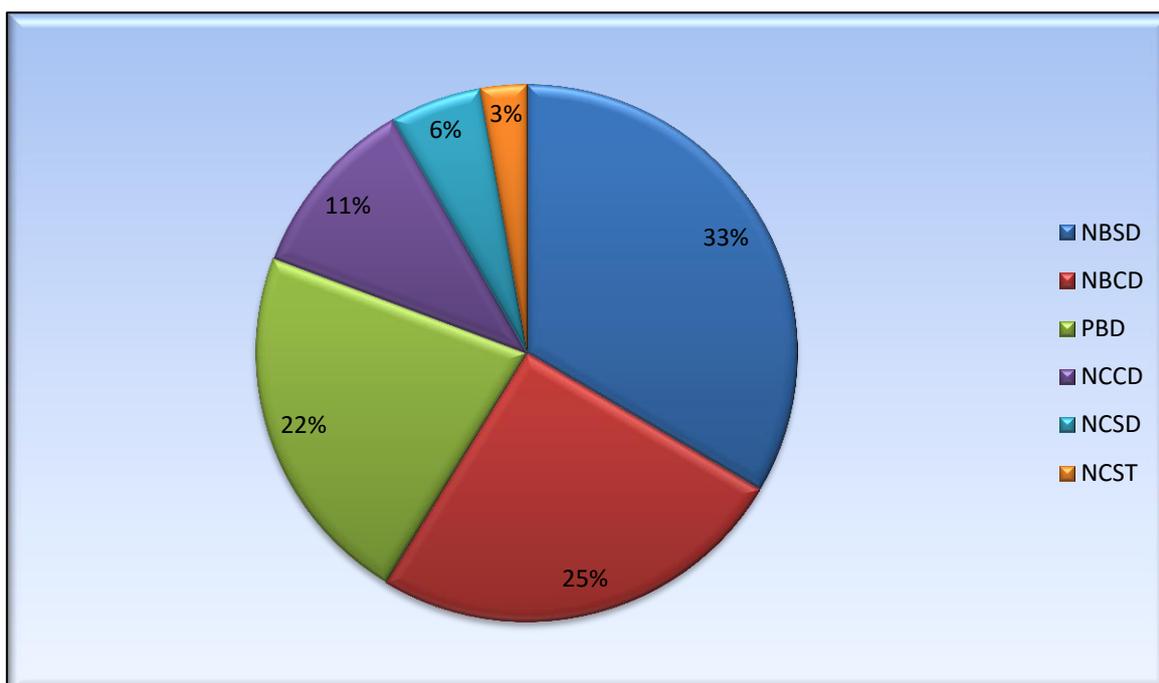


Figure 5.4: Taux des types de nécroses rencontrés dans les quatre stations.

5.1.2.2. Répartition des types de nécroses dans chaque station expérimentale

El Kala : Dans le Parc National d'El Kala (PNEK), nous remarquons que les types de nécroses NBSD, NBCD et PBD dominent le reste des nécroses, avec des taux de 32%, 29% et 16% respectivement, suivie des nécroses NCCD (10%), NCST(11%) et NCSD (2%) (Figure 5.5).

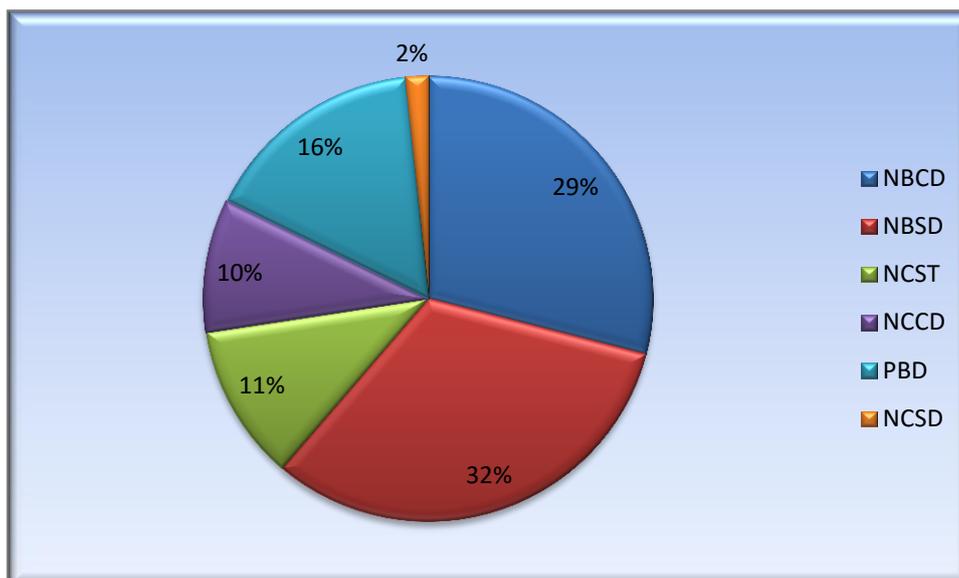


Figure 5.5 : Taux de répartition des types de nécroses à El Kala

Tlemcen : contrairement au PNEK, dans cette région ce sont les PBD qui dominent avec un taux de 38%. Nous avons observé en deuxième position les NBSD avec un taux enregistré de 28%, suivi des NBCD (13%), NCSD (13%) et NCCD (8%). Les nécroses NCCT sont absentes dans cette région (Figure 5.6).

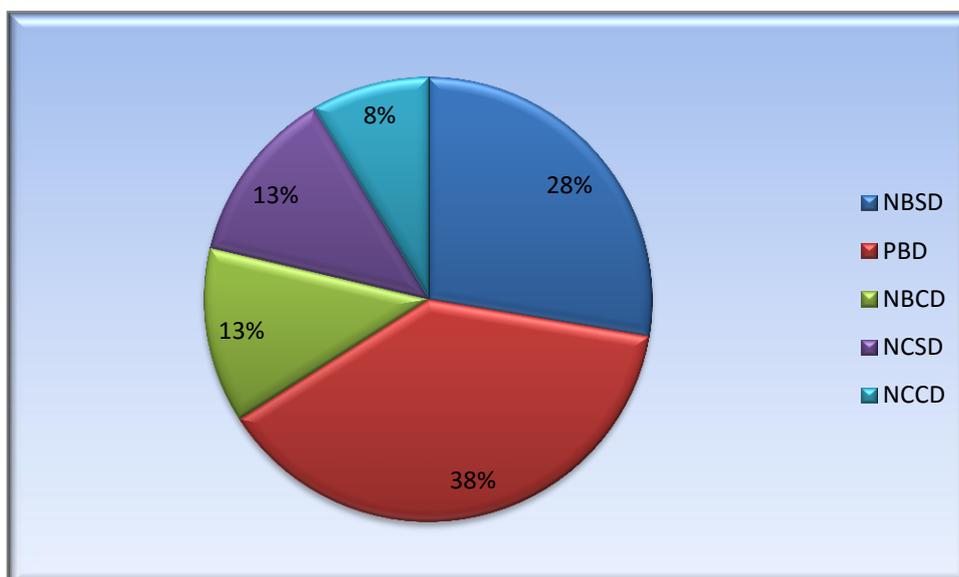


Figure 5.6 : Taux de répartition des types de nécroses à Tlemcen.

Batna : Au Parc de Belezma (Batna), quatre types de nécroses ont été trouvés. En tête, nous avons la nécrose de type NBSD (35%), suivie de la nécrose NCCD (29%), NBCD (23%), et PBD (13%) (Figure 5.7).

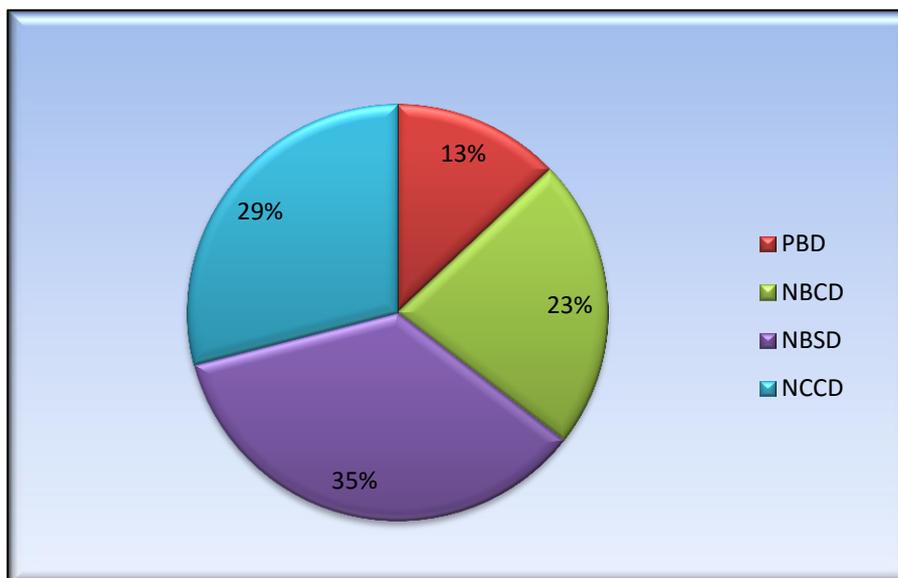


Figure 5.7 : Taux de répartition des types de nécroses à Batna.

Blida : En ce qui concerne les nécroses trouvées dans les branches et les troncs du Parc National de Chréa (Blida), ce sont les nécroses NBSD (40%) qui dominent, suivies par les NBCD (28%), les PBD (20%), les NCCD (7%) et les NCSD (5%) (Figure 5.8). Nous avons aussi constaté l'absence des nécroses NCST.

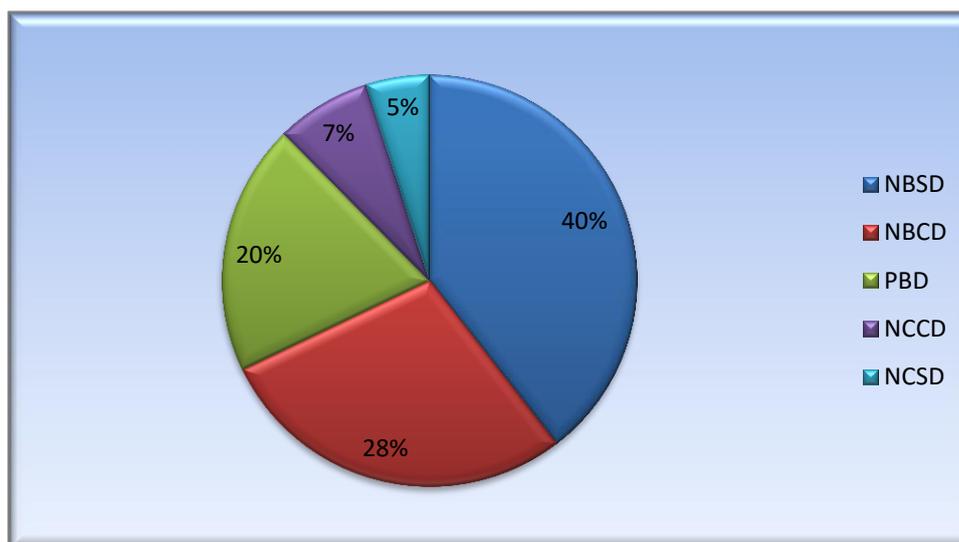


Figure 5.8 : Taux de répartition des types de nécroses à Blida.

5.1.2.3. Attribution des types de nécroses selon l'espèce

L'étude de l'attribution des types de nécroses selon les plantes hôtes (Figure 5.9), s'est révélée être la même pour les deux espèces de chêne étudiées, mais avec des taux variables où nous avons trouvé que le nombre des nécroses est plus important chez le chêne vert que chez le chêne liège, sauf dans le cas de la nécrose NCST qui est totalement absente chez le chêne vert.

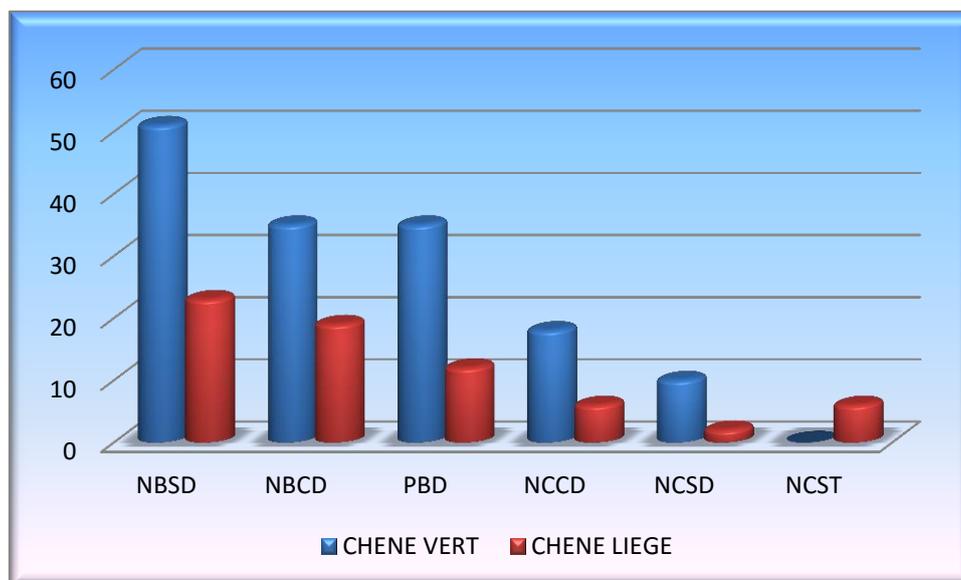


Figure 5.9 : Attribution des types de nécroses selon les plantes hôtes

5.2. Agents fongiques isolés

5.2.1. Fréquences d'isolement des agents fongiques

Les agents fongiques que nous avons isolés à partir des différentes nécroses, sont classés par ordre d'importance : *Botryosphaeriaceae* (56%), suivie de *Biscogniauxia* (24%) et des *Cytospora* (20%) (Tableau 5.1).

Les 200 isolats fongiques sont obtenus à partir des six types de nécroses associées aux arbres qui présentaient les symptômes de dépérissement (tableau 5.1). Nous avons pu constater aussi que les champignons ont été plus particulièrement isolés à partir des nécroses NBSD avec 73 isolats, suivis par les nécrose de type NBCD et PBD avec 50 et 48 isolats respectivement, 18 isolats ont pu être isolés à partir des nécroses NCCD, et seulement six et cinq isolats ont été pris à partir des nécroses NCSD et NCST.

On remarque aussi (tableau 5.1) que les *Botryosphaeriaceae* ont été isolés à partir de toutes les nécroses, plus particulièrement des NBSD et les ponctuations PBD, et très peu isolées à partir des nécroses NCSD et NCST. *Biscogniauxia* ont été isolés principalement des nécroses NBSD, NBCD et PBD avec 16, 23 et 9 isolats respectivement alors qu'elles n'ont pas pu être isolées à partir des NCCD, NCSD et les NCST, pareil pour les *Cytospora* qui ont comme origine les NBSD et les PBD avec 17 et 15 isolats, et les NBCD avec seulement huit isolats.

Tableau 5.1: Nombre d'isolat et fréquence d'isolement des agents fongiques isolés

Agent fongique	Nbr d'isolat	Type de nécrose						Fréq d'isolement
		NBSD	NBCD	PBD	NCCD	NCSD	NCST	
<i>Botryosphaeriaceae</i>	112	40	19	24	18	06	05	56 %
<i>Biscogniauxia</i>	48	16	23	09	00	00	00	24 %
<i>Cytospora</i>	40	17	08	15	00	00	00	20 %
TOTAL	200	73	50	48	18	06	05	100 %

5.2.2. Répartition géographique des agents fongiques isolés dans les quatre régions

La répartition géographique de ces différents agents fongiques (Figure 5.10), nous montre la dominance des espèces de la famille des *Botryosphaeriaceae* dans les région d'El Kala (76%), Blida (67%) et Batna (46%), alors qu'elle sont faibles à Tlemcen (12%). Pour le genre *Biscogniauxia*, la dominance se situe surtout à Tlemcen (48%), et se trouve à des taux faibles dans le reste des régions, El Kala (18%), Blida (11%) et Batna (9%). En ce qui concerne les *Cytospora*, ils sont présents en deuxième position à Batna (45%), Tlemcen (40%) et Blida (22%), et faiblement présent à El Kala (6%).

5.3. Identification des espèces de la famille des *Botryosphaeriaceae*

5.3.1. Caractérisation moléculaire des *Botryosphaeriaceae*

Un total de 28 isolats préalablement identifié sur la base des caractères morphologiques a fait l'objet de notre étude moléculaire dans le but de l'identification des agents pathogène isolés.

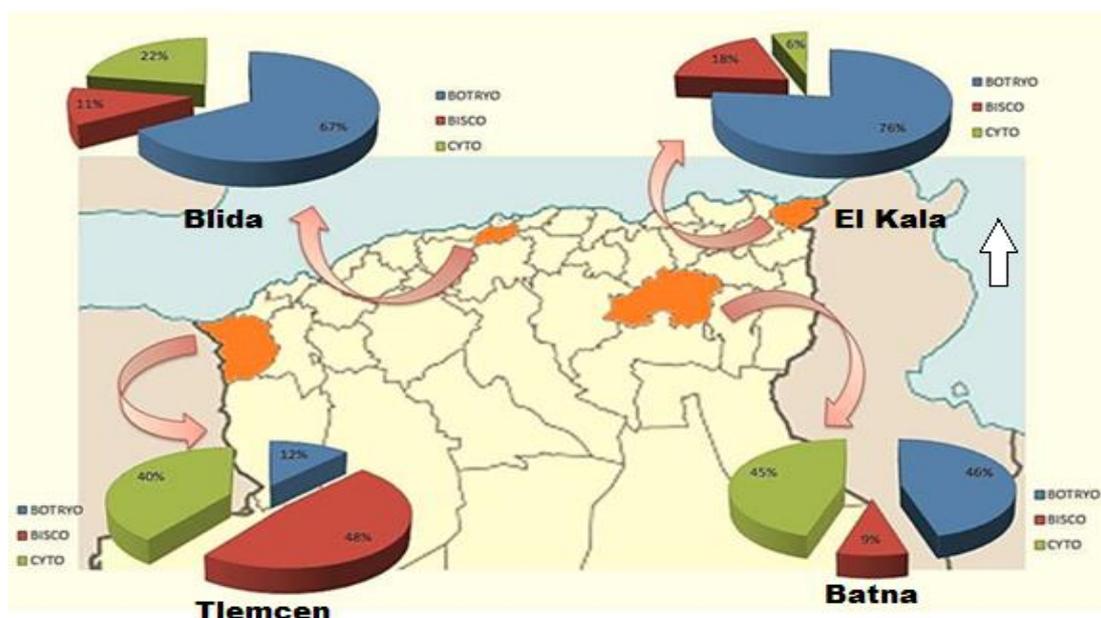


Figure 5.10 : Répartition géographique des agents fongiques isolés dans les quatre régions.

5.3.1.1 Séquençage et phylogénie

5.3.1.1.1. Amplification des ITS

L'amplification des régions ITS comprenant l'espaceur ITS1 (gène 5.8S) et l'espaceur ITS2 à l'aide des amorces universelles ITS1 et ITS4 [113], a généré un fragment unique d'environ 600 pb chez les 28 isolats (Figure 5.11). L'ensemble de ces séquences fût copié sur Blast après avoir été corrigé afin de connaître les espèces en question ; il s'agit de 18 isolats de *D.corticola*, six isolats appartenant à *B. dothidea* et enfin quatre qui font partie de *Dothiorella iberica* avec des taux de ressemblance qui varient de 98 à 100%.

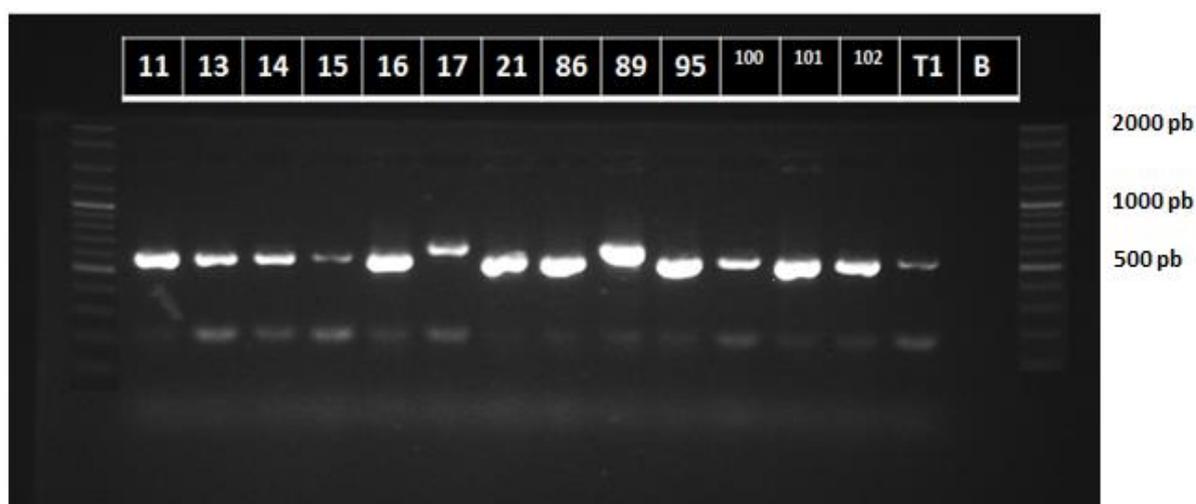


Figure 5.11 : Quelques produits d'amplification de la région ITS des *Botryosphaeriaceae*. **B** : Témoin

5.3.1.1.2. Amplification du gène du facteur d'élongation

L'amplification du gène EF-1 α avec les amorces EF1-728F et EF1-986R des 18 isolats des espèces appartenant au genre *Diplodia*, a permis l'obtention d'un seul fragment d'environ 300 pb pour tous les isolats (Figure 5.12).

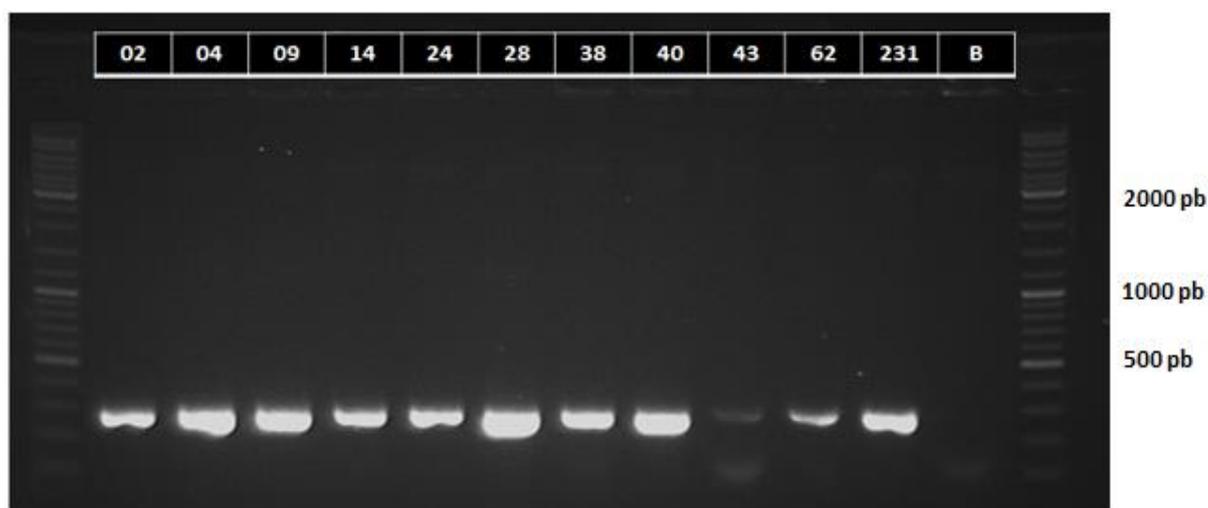


Figure 5.12 : Quelques produits d'amplification du gène EF-1 α de *Botryosphaeriaceae*. **B** : Témoin

5.3.1.2 Analyses phylogénétiques

Notre étude nous a permis d'identifier des espèces appartenant à trois genres différents, à savoir : *Diplodia*, *Dothiorella* et *Botryosphaeria* ; afin de faciliter les analyses phylogénétiques, nous avons séparé les genres identifiés en deux groupes : le premier étant exclusivement composé d'espèces du genre *Diplodia*, le second, inclut les espèces du genre *Dothiorella* et *Botryosphaeria*. L'ensemble des séquences de ITS et TEF des 28 isolats correspondant à nos trois espèces vont être intégrées dans la base de données GenBank, les données concernant l'ensemble des isolats de cette étude sont représentées dans le tableau 5.2.

Tableau 5.2 : Données relatives aux espèces isolées dans cette étude

Espece	N° d'isolat	Origine	Plante hôte	Collecteur	N° d'accession GenBank	
					ITS	TEF
<i>D. corticola</i>	50	Taref, El Kala	<i>Quercus suber</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	1	Taref, El Kala	<i>Quercus suber</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	9	Taref, El Kala	<i>Quercus suber</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	23	Taref, El Kala	<i>Quercus suber</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	78	Taref, El Kala	<i>Quercus suber</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	28	Taref, El Kala	<i>Quercus suber</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	7	Taref, El Kala	<i>Quercus suber</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	47	Taref, El Kala	<i>Quercus suber</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	24	Taref, El Kala	<i>Quercus suber</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	4	Taref, El Kala	<i>Quercus suber</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	63	Taref, El Kala	<i>Quercus suber</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	14	Taref, El Kala	<i>Quercus suber</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	40	Taref, El Kala	<i>Quercus suber</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	2	Taref, El Kala	<i>Quercus suber</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	12	Belezma, Batna	<i>Quercus ilex</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	8	Taref, El Kala	<i>Quercus suber</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	227	Taref, El Kala	<i>Quercus suber</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	38	Taref, El Kala	<i>Quercus suber</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
<i>B. dothidea</i>	51	Chr�ea, Blida	<i>Quercus ilex</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	18	Belezma, Batna	<i>Quercus ilex</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	20	Belezma, Batna	<i>Quercus ilex</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	19	Belezma, Batna	<i>Quercus ilex</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	115	Chr�ea, Blida	<i>Quercus ilex</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	116	Chr�ea, Blida	<i>Quercus ilex</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
<i>Do. iberica</i>	17	Hafir, Tlemcen	<i>Quercus ilex</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	114	Chr�ea, Blida	<i>Quercus suber</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	74	Zariffet, Tlemcen	<i>Quercus ilex</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX
	22	Zariffet, Tlemcen	<i>Quercus ilex</i>	S. Chouih	XXXXXX	XXXXXX

- **L'analyse du groupe I :**

Deux analyses ont été effectuées pour ce genre, la première en utilisant les séquences du gène ITS seulement, et la deuxième en alignant les séquences ITS et celles du facteur d'élongation EF-1a

a. Analyse des séquences du gène ITS :

L'alignement de 55 taxa dont 18 appartenant à cette étude et deux outgroup contenait 736 caractères à partir desquels 519 étaient retenus, dont 403 étaient constants et neuf variables non informatifs. L'analyse des 109 caractères informatifs restants a abouti à 27 arbres résultant de maximum de parcimonie avec une longueur de 227 pas, un indice de tolérance de CI = 0,749, un indice de rétention RI = 0,946 et un indice d'homoplasie HI = 0,251. Les analyses de maximum de parcimonie (MP) et Neighbourjoining (NJ) ont produit des arbres avec la même topologie. Un des 27 arbres obtenus par la méthode MP est présenté dans la figure 5.13. Un seul clade est présent avec 18 sous-clades présentant l'ensemble des espèces appartenant au genre *Diplodia*. Les 18 séquences de nos isolats se sont regroupées avec l'espèce *Diplodia corticola* et sont très stables et bien soutenues avec des valeurs Bootstraps de 95% pour MP et 100% pour NJ. (Figure 5.13)

b. Analyse combinée des gènes ITS et EF :

Cette analyse a été effectuée en combinant les séquences des deux régions ITS et EF. L'analyse des séquences de 18 de nos isolats combinés avec 30 taxa et 2 outgroup récupérés de GenBank se composait de 1481 caractères, parmi eux 692 étaient exclus de l'étude (547 étaient constants, 15 étaient variables et non informatifs et 227 étaient informatifs). Une recherche heuristique de ces derniers a permis d'avoir 4 arbres de 488 pas ainsi que les valeurs d'indice suivantes : CI = 0,732, RI = 0,937, HI = 0,268. Les arbres ne diffèrent que par la position des bornes de taxons et ont montré une topologie similaire que ça soit par la méthode MP ou par la méthode NJ. Un seul clade a été observé où l'on trouve plusieurs sous-clades soutenus par des valeurs bootstrap élevées. 18 de nos isolats ont été inclus avec l'espèce *Diplodia corticola* avec des valeurs MP/NJ de 99/98 (Figure 1.14).

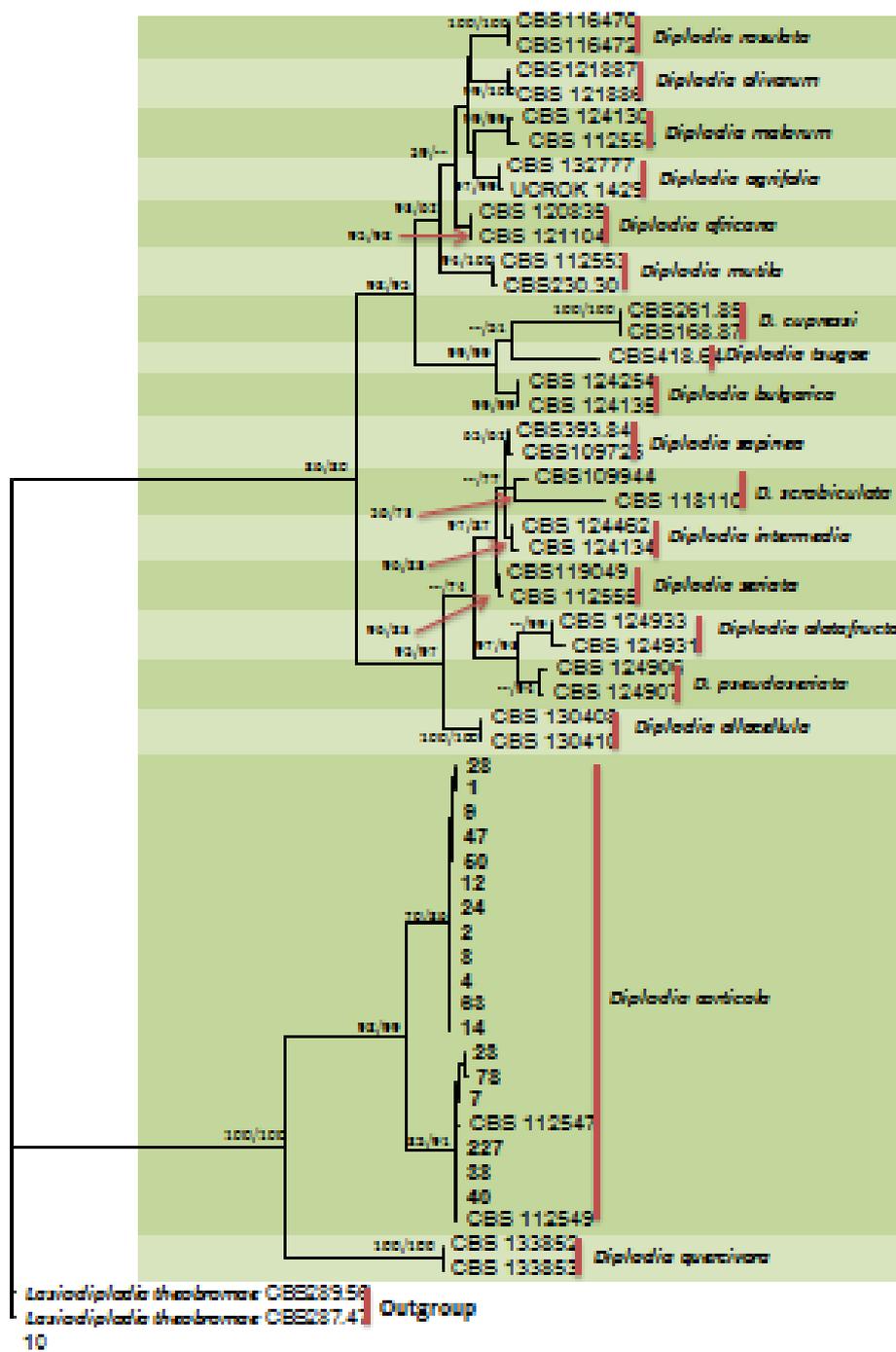


Figure 5.14 : Un des 4 arbres phylogénétiques obtenus par maximum de parcimonie à partir de l'alignement combiné des séquences ITS et TEF(488 pas, CI= 0,732, RI= 0,937, HI= 0,268). Les valeurs sur les lignes sont les valeurs Bootstrap avec un rééchantillonnage de 1000 fois. *Lasiodiplodia theobromae* a été utilisées comme outgroup

Au sein de ce sous-clade on remarque aussi que les isolats n° « 23, 78, 7, 227, 38, 40 » se regroupent avec la séquence type de *D. corticola* qui porte la référence CBS 112547, alors que le reste des isolats n° « 28, 1, 9, 47, 50, 12, 24, 2, 8, 4, 63, 14 » ont formé un groupe à part très bien soutenu avec des valeurs bootstraps de 70% (MP) et 86% (NJ).

- **l'analyse du groupe II :**

Les séquences du gène ITS de 10 isolats ont été combinées et alignées avec les séquences de 38 espèces récupérées de GenBank. 455 caractères ont été retenus pour cette analyse dont 345 constants, 13 variables et non informatifs et 97 caractères informatifs. Cette analyse nous a fourni 210 arbres avec une longueur de 210 pas, un indice de tolérance CI de 0,762, un indice de rétention de 0,956 et un indice d'homoplasie de 0,238. Les arbres issus de l'analyse NJ et MP étaient identiques, un de ces derniers est représenté dans la figure 5.15 où 20 sous-clades représentant 20 espèces appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae* ont été constatées dans deux clades majeurs correspondant au genre *Dothiorella* avec 13 sous-clades et à *Botryosphaeria* avec sept sous-clades (Figure 5.15).

Parmi nos 10 isolats, quatre (17, 114, 74 et 22) se sont regroupés dans le clade I avec l'espèce *Dothiorella iberica* affichant des valeurs de bootstraps de 74% pour MP et 85 pour NJ. Les isolats 51, 18, 20, 19, 115 et 116 se sont placés au sein du clade II avec l'espèce *B. dothidea* avec des valeurs de 56% pour MP.

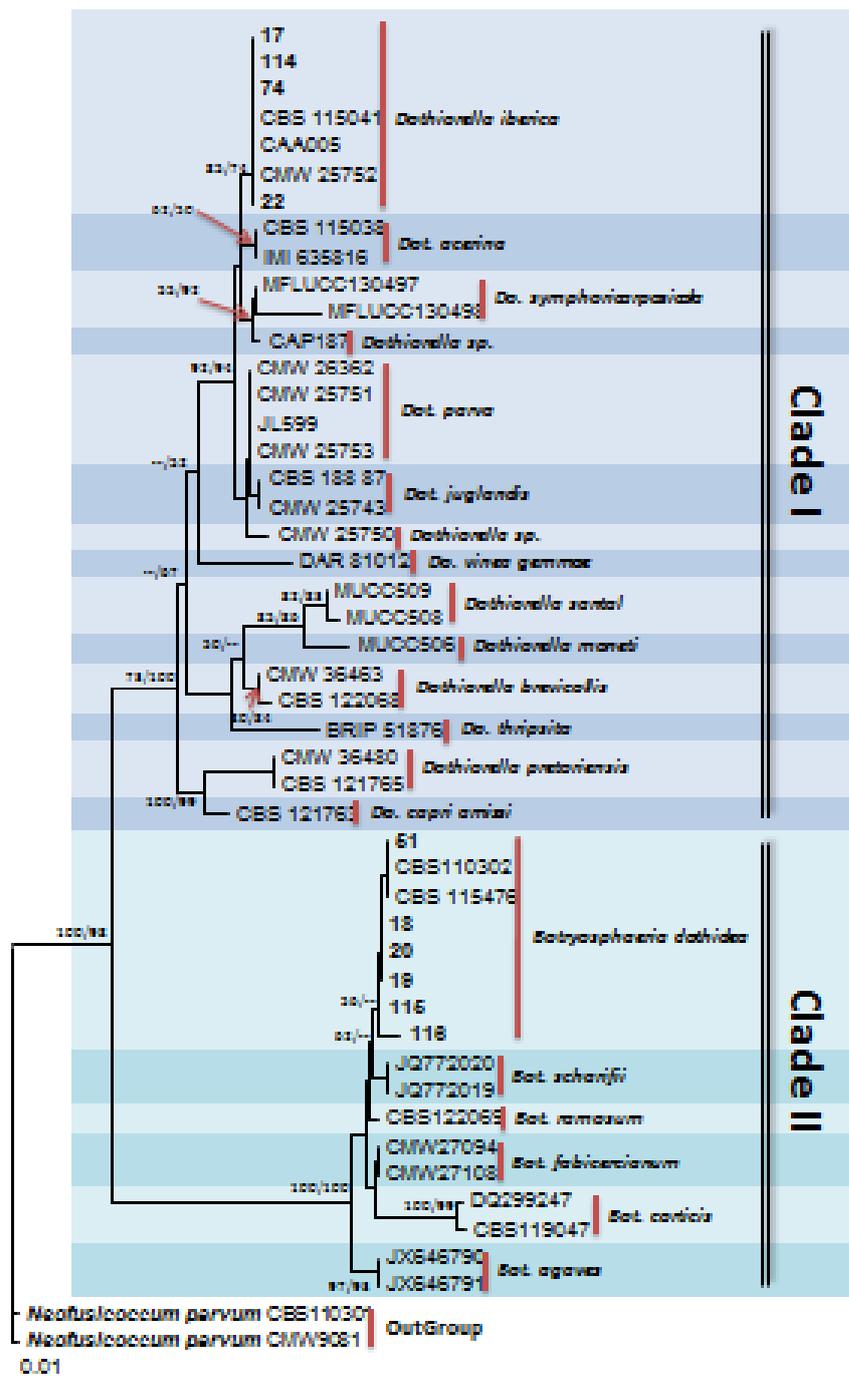


Figure 5.15 : Un des 210 arbres phylogénétiques obtenus par maximum de parcimonie à partir de l'alignement combiné des séquences ITS et TEF(210 pas, CI= 0,762, RI= 0,956, HI= 0,238). Les valeurs sur les lignes sont les valeurs Bootstrap avec un rééchantillonnage de 1000 fois. *Neofusicoccum parvum* a été utilisées comme outgroup

5.3.2. Fréquences d'isolement des *Botryosphaeriaceae*

L'analyse phylogénétique révèle l'existence de trois espèces appartenant à trois genres différents. Les espèces les plus isolées sont *Diplodia corticola*, *Bothryospharia dothidea* et *Dothiorella iberica* avec des fréquences d'isolement de 64,51%, 19,35% et 16,13% (Tableau 5.3). Nous remarquons clairement que *D. corticola* est de loin l'espèce la plus isolée des trois.

D.corticola a été isolée beaucoup plus à partir des NBSD (35%) et des NBCD (30%), alors que *B. dothidea* a été le plus souvent isolée à partir des NBSD, des NBCD et des NCCD (34%, 33% et 33%) par contre *Do. iberica* a été isolée principalement des PBD avec (40%) (Figure 5.16).

Tableau 5.3 : Fréquences d'isolement des *Botryosphaeriaceae*

Agent fongique	Nombre d'isolat	Fréquences d'isolement %
<i>D.corticola</i>	18	64,51
<i>B.Dothidea</i>	06	19,35
<i>Do.iberica</i>	04	16,13

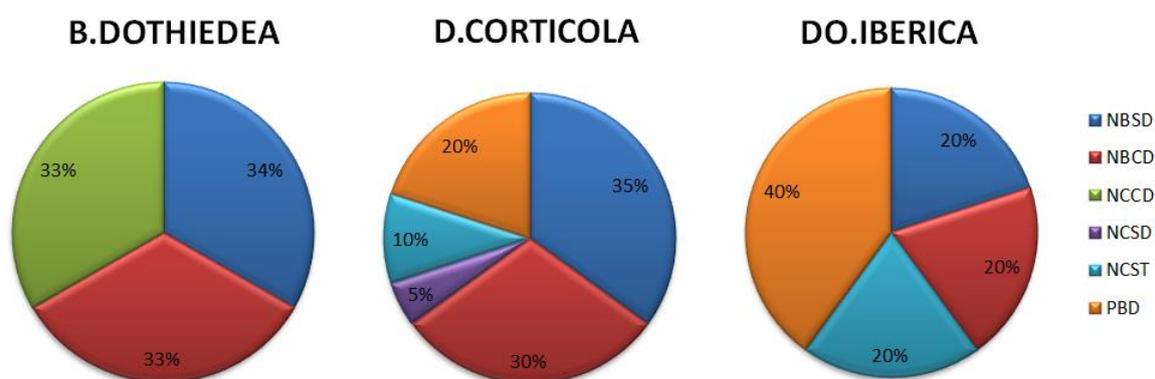


Figure 5.16 : Fréquences d'isolement de *D. corticola*, *B. dothidea* et *Do. iberica*

En comparant la répartition géographique des deux espèces (*D. corticola* et *B. dothidea*) (Figure 5.17), nous remarquons clairement que *D.corticola* n'est présente qu'à El Kala et Batna avec des taux respectifs de 100% et 20%, alors que *B. dothidae* est dominante à Tlemcen, Batna et Blida avec des taux respectifs de 100%, 67% et 60%.

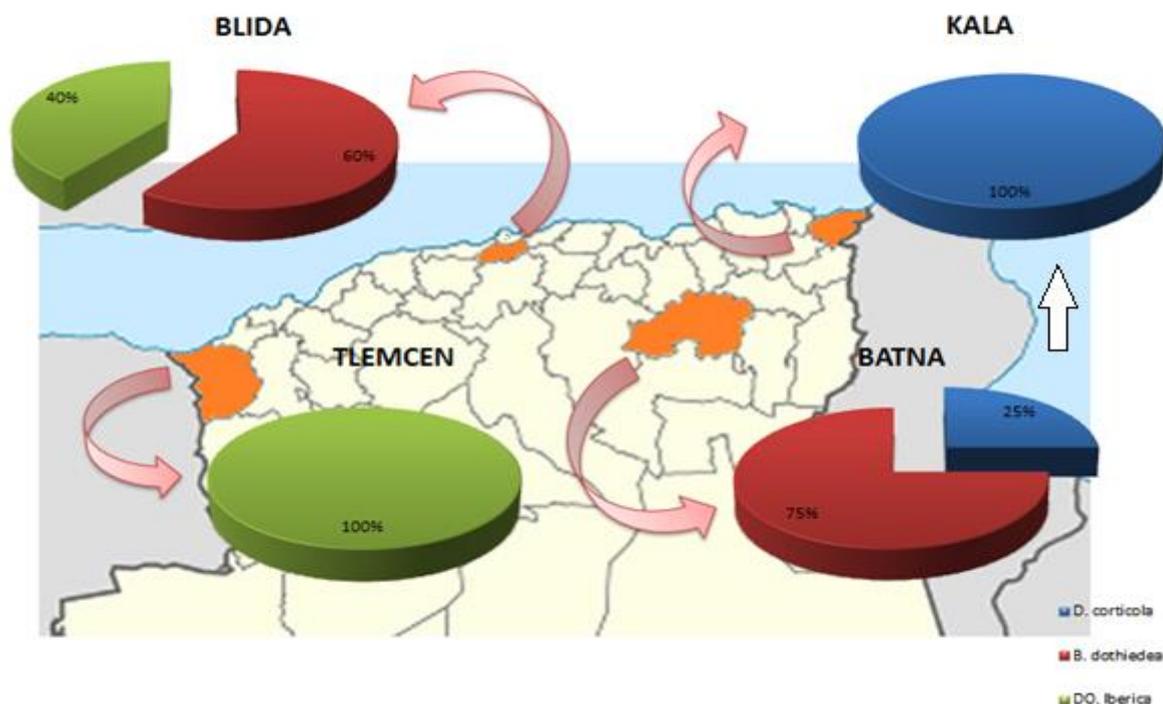


Figure 5.17 : Répartition géographique de *D. corticola*, *Dot. Iberica* et *B. dothieda*

5.3.3. Caractérisation morphologiques des espèces des *Botryosphaeriaceae*

La plupart des isolats ont formé des stromas conidifères contenant des conidies matures au bout de 14 à 21 jours d'incubation sur des brindilles de peuplier à 25°C. Les stromas diffèrent morphologiquement selon l'espèce. Cette différence s'observe au niveau de la forme, la couleur et le degré d'agrégation.

- ***Diplodia corticola* :**

Les stromas conidifères apparaissent isolés sur les brindilles de peuplier, parfois groupés. Ils sont dépourvus de mycélium et leur couleur varie du brun foncé au noir ; les conidies sont lisses, unicellulaires, cylindrique avec des extrémités largement arrondies, leur couleur est d'un brun clair et peuvent présenter une à deux cloisons (Figure 5.18 a-d). Elles mesurent ((23.5-) 26-35 (-41) (10-) 11-17 (-18.5) pm, moyenne de 50 conidies = $29,9 \pm 2,6 \times 13,6 \pm 1,4$ um.

Les colonies ont une croissance très rapide sur le milieu PDA. Le mycélium est cotonneux avec un pourtour régulier. Sa couleur est d'abord blanche, puis elle tourne vers un gris foncé après cinq à sept jours ; vu du dessous, la couleur de la culture vire vers un vert olive puis elle devient noire (Figure 5.18).

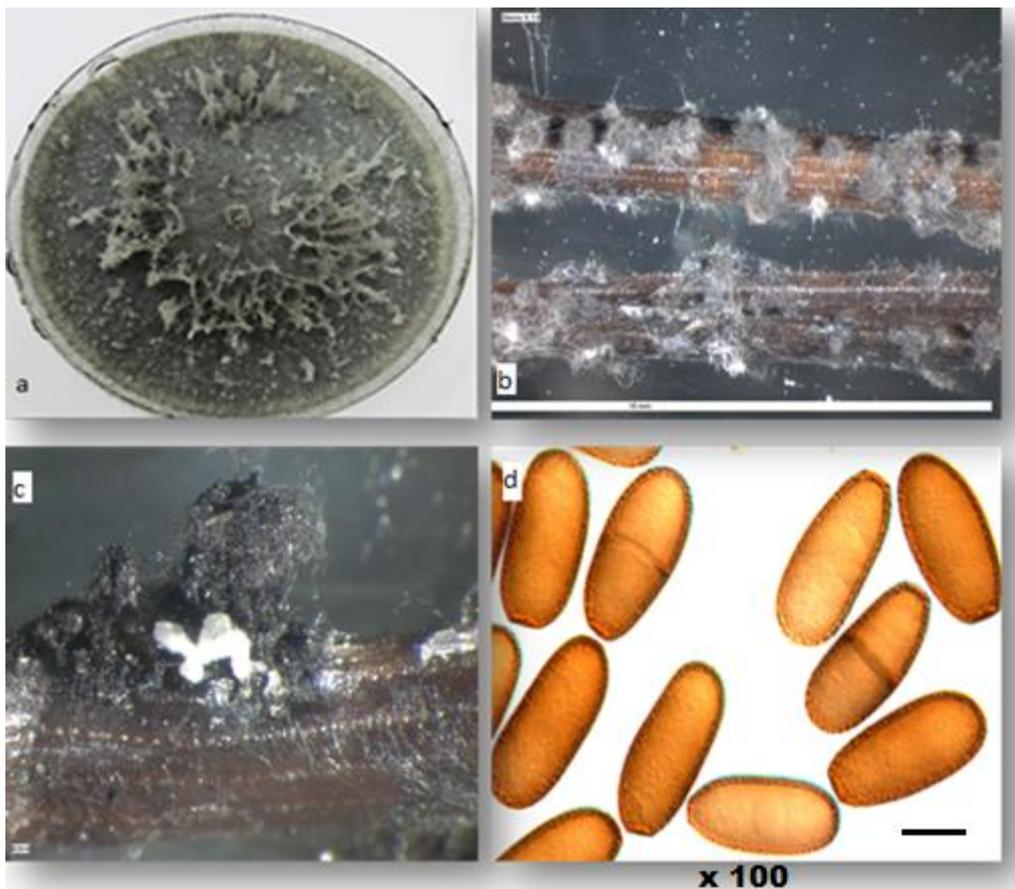


Figure 5.18: *Diplodia corticola*, **a.** culture agée de 15 jours sur milieu PDA, **b.** stromas sur brindilles de peuplier, **c.** libération d'une masse de conidies à partir d'une pycnide, **d.** conidies

- ***Botryosphaeria dothidea***

Sur les brindilles du peuplier, les pycnides sont généralement solitaires, globuleuses. Elles se disposent superficiellement sur le tissu de l'hôte. Les colonies de *B. dothidea* en développement sur PDA sont d'abord blanches avec un mycélium aérien abondant, devenant d'une couleur olive foncé du centre puis la coloration foncée se propage à l'ensemble de la colonie qui devient de plus en plus sombre. Les colonies ont une croissance très rapide; elles arrivent à un diamètre de 17 à 20 mm après 24h d'incubation à 25°C sur PDA.

Les conidies sont fusiformes, hyalines et lisses ; elles deviennent brun clair, avec l'âge et développent une ou deux cloisons ; les conidiophores sont cylindriques et fusiformes ; les conidies mesurent (12-) 15,6-17 (-19,9) par (4,1) 5,5 à 5,9(-7,1) µm; la moyenne et l'écart-type de 50 conidies sont de $23,1 \pm 2,18$ par $6,15 \pm 0,63$ (Figure 5.19).

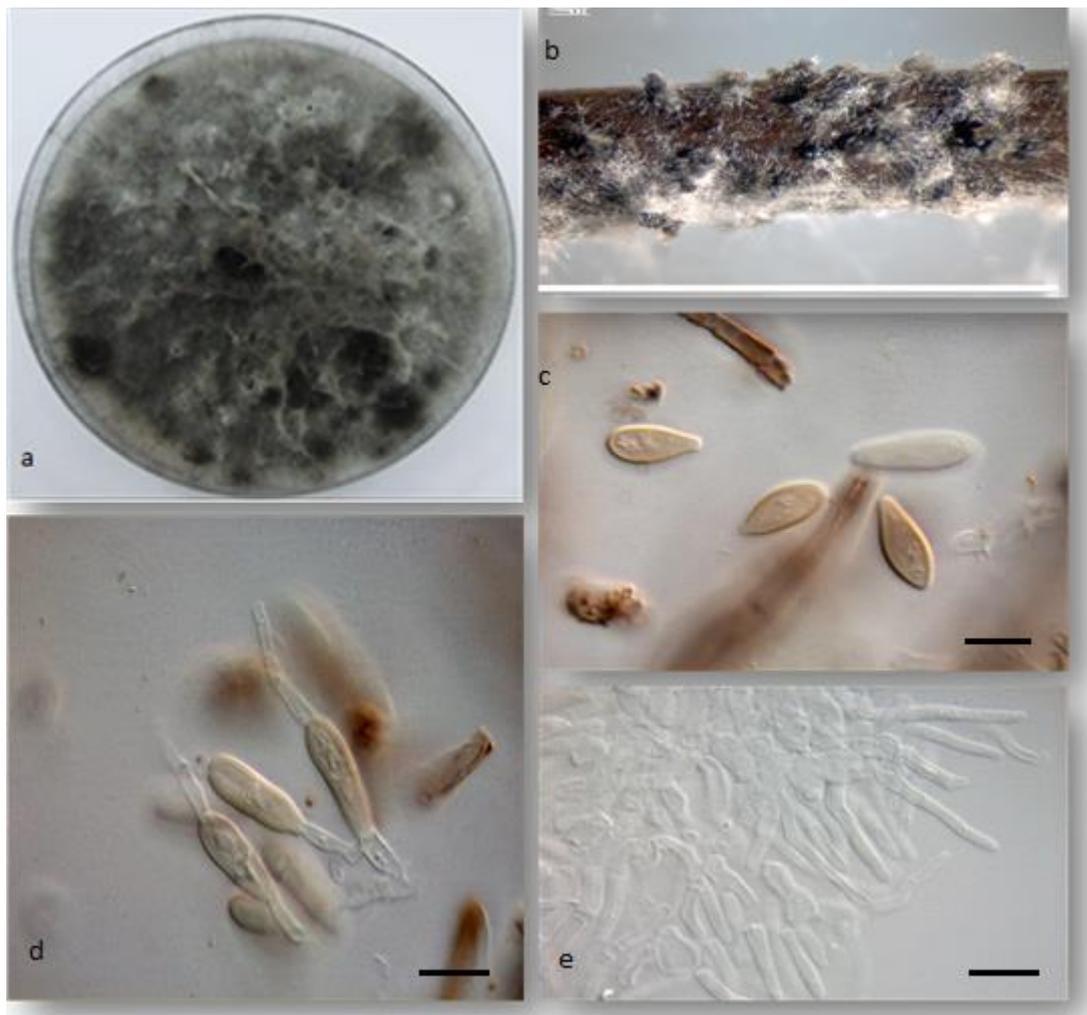


Figure 5.19: *B. dothidea*, **a.** culture âgée de 15 jours sur milieu PDA, **b.** stromas sur brindilles de peuplier, **c.** conidies, **d.** germination conidienne **e.** conidiophores

- ***Dothiorella iberica*:**

Les cultures de *Do. iberica* ont un aspect cotonneux sur milieu PDA avec un mycélium aérien épais et ramifié, incolore au départ puis il devient vert olive à gris à la surface et vert foncé en dessous, après 2 semaines dans l'obscurité à 25°C. Malheureusement les observations et les mensurations au microscope n'ont pas eu lieu car les isolats testés n'ont pas sporulé sur les brindilles de peuplier (Figure 5.20).

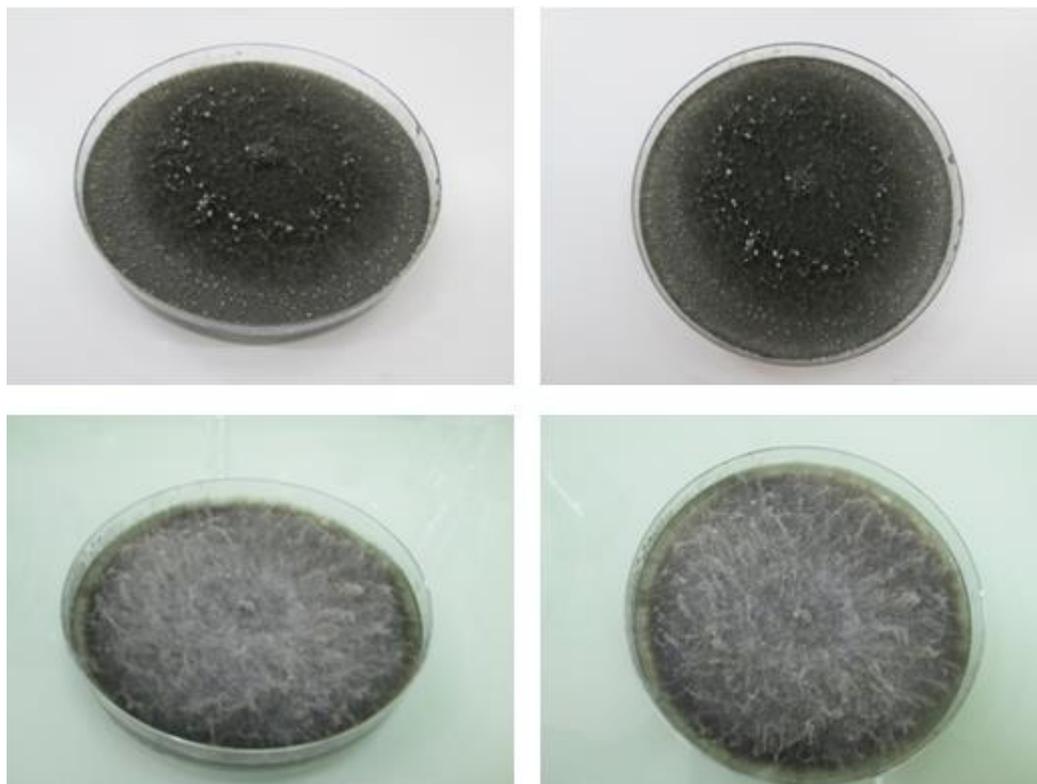


Figure 5.20 : colonies de *Dothiorella iberica* âgées de 15 jours sur milieu PDA

5.4. Test de pathogénicité

Les isolats des deux espèces (*D.corticola* et *B.dothidea*), ont produit une lésion nécrotique noire quatre semaines après inoculation des rameaux de chêne. Nous avons remarqué que l'espèce de l'agent fongique la plus virulente sur le chêne liège était *D. corticola* qui a causé des nécroses avec une moyenne de 13,8cm et 10,36cm pour les isolats 20G et 24B. Ces lésions sont significativement plus longues que celles causés par *B. dothidea* qui a enregistré des moyennes de 2,16cm et 0,26cm pour les isolats 58C et 49A, mais qui reste pathogène malgré sa faible gravité (Figure 5.21, Tableau 5.4).

Dans le cas du chêne vert, les deux espèces se présentent beaucoup moins virulentes car elles causent des lésions beaucoup moins longues que celles enregistrées sur le chêne liège ; les moyennes enregistrées sont autour de 0,5cm. Il est à noter que l'ensemble des témoins dans cette expérience n'ont montré aucune lésion

Les postulats de Koch se voient confirmés et les isolats testés ont été récupérés avec succès à partir des tissus inoculés.

Tableau 5.4 : Dimensions des nécroses causées par *D. corticola* et *B. Dothieda* chez le chêne liège et le chêne vert

Plante hôte	Espèce	Isolat	Dimension moyenne		Dimension Max-Min	
			Longueur	Largeur	Longueur	Largeur
Chêne liège	<i>D.corticola</i>	20G	13,8	1,28	23,5/2	1,6/0,8
		24B	10,36	0,96	18/2,5	1,7/0,7
	<i>B.dothieda</i>	58C	2,16	0,98	06/0,7	1,8/0,7
		49A	0,26	0,26	0,8/00	0,8/00
Chêne vert	<i>D.corticola</i>	20G	0,5	0,2	2,5/00	01/00
		24B	0,3	0,28	0,8/00	0,7/00
	<i>B.dothieda</i>	58C	0,52	0,32	1,8/00	0,9/00
		49A	0,224	0,244	0,8/00	0,7/00



Figure 5.21 : Exemple de lésions sur branche de chêne.

5.5. DISCUSSION

Différents symptômes foliaires de dépérissement ont été trouvés sur les essences de chêne pendant cette étude ; les plus prononcés sont la défoliation, le dessèchement et la mort des branches et de l'arbre entier et le remplacement de celui-ci par d'autres essences. Selon HEWITT [132], le dépérissement se caractérise par un déclin des arbres qui débute par sa partie apicale, par la présence de chancres sur les rameaux atteints sur lesquels on observe souvent des pycnides en surface et enfin par la présence de chancres sur le tronc.

Selon FRENCH et STIENSTRA [133], chez le chêne, les symptômes comprennent le flétrissement et le brunissement du feuillage commençant à la cime de l'arbre et aux extrémités des branches; ils se répandent ensuite rapidement à toute la couronne ; chaque feuille brunit progressivement, de l'extrémité à la base, laissant parfois une petite zone de tissu vert à la base, autour de la nervure médiane.

Nous avons pu constater, lors de nos sorties sur le terrain, que les symptômes étaient beaucoup plus prononcés chez le chêne liège que chez le chêne vert ; ceci peut être expliqué par la réputation de ce dernier d'être résistant à la plupart des maladies, insectes et ravageurs. Il a une longévité très élevée. En effet, les sujets de chêne vert résistent mieux au flétrissement et peuvent vivre plusieurs années avant de dépérir. Certains peuvent même se rétablir. *Quercus ilex* peut être porteur de champignons sans manifester de symptômes foliaires. En général, le brunissement est moins prononcé et la défoliation moins grave chez le chêne vert, n'affectant souvent que quelques branches des sujets atteints [133].

L'analyse des sections de bois provenant de différents compartiments des essences a indiqué la présence de plusieurs types de nécrose. Pour l'ensemble des arbres examinés, le type de nécrose le plus rencontré est la nécrose brune et dure en position sectorielle ; ce même type de nécrose a été rencontré sur la vigne en Espagne [130], en Californie [108] et en Australie [134]. La nécrose brune centrale vient en deuxième place ; cette nécrose est la plus commune en France et en Italie sur la vigne aussi [135] ; [136] ; [137]. Cependant, il a été souligné que plusieurs

types de nécroses peuvent cohabiter sur la même branche ce qui veut dire que l'arbre est sans doute colonisé par un complexe de plusieurs agents fongiques.

L'attribution des différents types de nécroses aux différents agents fongiques, nous a permis de voir que les *Botryosphaeriaceae* sont principalement isolées à partir des NBSD et moins rencontrées au niveau des nécroses centrales et des punctuations ; URBEZ-TORRES et al. [108] ont également isolé les *Botryosphaeriaceae* à partir des nécroses sectorielles. LARIGNON [131] explique leur présence dans la plupart des nécroses par leur capacité à se développer dans le bois sain sans avoir un effet appréciable sur celui-ci. Mais FERREIRA et al., suggèrent l'hypothèse d'une colonisation primaire du bois par ces agents fongiques.

Sur la base d'une identification morphologique préliminaire, nous avons déterminé, par ordre d'importance: *Botryosphaeriaceae*, *Biscogniauxia* et *Cytospora*. Ces agents pathogènes fongiques ont été fréquemment rapportés comme des agents qui causent le chancre du tronc et le dépérissement des branches [139] ; [140] ; [141] ; [142] ; [143] ; [144]. Par contre, les *Cytospora* ont rarement été signalés sur *Quercus* ; d'ailleurs il n'existe pas encore de littérature pour le confirmer.

Dans le bassin méditerranéen, une baisse sévère de l'espèce *Quercus sp.* a été remarquée depuis le début des années 1990. Un large éventail de facteurs a été associé à cette baisse [139]. Plusieurs espèces des *Botryosphaeriaceae* sont rapportées dans la littérature comme étant des agents pathogènes associés au déclin du chêne dans le monde. Au cours des dernières années, ces espèces ont suscité de grandes préoccupations en raison de leur impact négatif sur les écosystèmes du chêne dans les pays méditerranéens, en particulier dans les forêts de chêne-liège où ils limitent à la fois la vitalité et la productivité des arbres.

Bien que de nombreuses études aient contribué à élucider l'identité [114] ; [83] et la pathogénicité [145] ; [146] ; [147] ; [148] des espèces de *Botryosphaeriaceae* survenant sur *Quercus sp.*, à ce jour, peu d'informations sont disponibles sur leur répartition géographique, la gamme de chênes hôtes ou leurs variabilités génétiques dans tous les pays.

Dans la présente étude, trois (3) espèces appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae* ont été identifiées sur la base des marqueurs phylogénétiques ; il s'agit de : *Diplodia corticola*, *Botryosphaeria dothidea* et *Dothiorella Iberica*.

Diplodia corticola est l'espèce la plus isolée, avec une fréquence de 64,51% ; elle fait partie de la mycoflore phytopathogène de nombreux arbres agricoles et forestiers (*Quercus*, *Pinus*, *Eucalyptus*...), et est d'importance économique en causant dépérissement, chancres et brûlures des pousses [114] ;[149]. Elle est considérée comme l'un des facteurs contribuant au déclin des subéraies méditerranéennes [150] ;[151] ;[142]. L'intensité de sa pathogénicité augmente lorsque la plante souffre d'un stress hydrique [152] provoquant, en général, sa mort qui survient deux à trois ans après l'apparition des symptômes [153].

D. corticola a été signalée en Espagne, au Portugal et en Italie par SANCHEZ et al., 2003, ALVES et al [114], en Espagne par LUQUE et al, [153]; SANCHEZ et al, [142], au Maroc par EL-BADRI et ABADIE, [154] et en Hongrie par VAJNA et al., [155].

Phylogénétiquement, *D. corticola* est étroitement liée à *D. quercivora* et ensemble, elles forment un sous-clade distinct et bien soutenu (MP bootstrap 100%) au sein du genre *Diplodia*. Il est intéressant de noter que ce sous-clade comprend exclusivement les espèces connues pour être responsables du dépérissement et des chancres sur *Q. suber* et *Q. ilex* dans plusieurs régions de la méditerranée.

D. corticola se distingue de l'espèce la plus étroitement liée à elle, à savoir *D. quercivora*, par la taille des conidies et le cloisonnement ; les conidies de *D. quercivora* dépassent rarement 31 mm de longueur, tandis que celles de *D. corticola* peuvent dépasser 40 mm ; les conidies âgées de *D. corticola* forment habituellement une à trois cloisons, alors que chez *D. quercivora* un seul septum a été observé

L'identité de certaines espèces de *Diplodia* survenant sur *Quercus sp* n'est pas encore entièrement clarifiée et des études supplémentaires sont donc nécessaires.

L'espèce *Botryosphaeria dothidea* a été moins isolée ; elle constitue 19,35 % de l'ensemble des *Botryosphaeriaceae* obtenus dans cette étude. Cette espèce est pathogène et cause de nombreux dégâts sur une large gamme d'hôtes [156].

Les rapports sur les hôtes de cette espèce parus avant l'année 2000 ne sont pas fiables parce que le concept de cette espèce n'était pas clair jusqu'à ce que Slipers et al. [157] redéfinissent et proposent des cultures néotype, épitype et ex-épitype. Il est fort probable qu'avant cette date, certaines des espèces identifiées peuvent avoir été des espèces de *Neofusicoccum*, cependant, certains rapports récents confirment différents hôtes ; à titre d'exemple, chez l'eucalyptus ce champignon provoque des chancres et le dépérissement [158] ; *B. dothidea* provoque également l'une des maladies du pommier la plus destructrice dans le monde : *Malus domestica* Borkh [159], entraînant la pourriture des fruits ainsi de vastes chancres sur les branches, pour aboutir finalement à la mort des arbres.

Cette espèce a été signalée comme étant un agent pathogène nuisible au peuplier en Chine [160] où elle a eu un impact significatif sur la santé et la productivité de l'espèce *Populus* [161]. Le champignon a également été signalé sur *Populus tremula* L. en Italie [162] et au Portugal [108] ; elle a aussi causé des dommages sur *Populus nigra* L. [163]. et sur *Vitis vinifera* en Algérie [112].

Sur le chêne, cette espèce a été signalée sur *Quercus suber*, *Q. ilex* par SANCHEZ et al., [142] et sur *Quercus* sp., par ABDOLLAHZADEH et al. [164].

Dothiorella iberica a été la moins isolée parmi les trois espèces dans notre étude avec 16,13% seulement et a été signalée pour la première fois en Algérie sur *Quercus* sp. L'identité de cette espèce a été confirmée par la comparaison avec d'autres espèces *Dothiorella* connus des cultures sur la base des séquences ITS.

Dothiorella Iberica a été isolée à partir de divers hôtes, principalement ligneux, y compris les arbres forestiers et fruitiers, la vigne et les plantes ornementales, et a été enregistrée dans de nombreux pays à travers le monde. [165], Cette espèce a été décrite par PHILLIPS et al [83] à partir de *Quercus ilex* en Espagne et a été aussi enregistrée sur *J. communis* au Portugal [166] et est susceptible d'être généralisée dans la région méditerranéenne. En Algérie, AZOUAOU-IDJER et al [167] l'ont

signalée sur *Cupressus* ; elle a aussi été décrite sur *Vitis* en Nouvelle zélande et au Portugal par BASKARATEVAN et al [168].

Morphologiquement, cette espèce est semblable à *D. sarmentosum*, mais on peut les distinguer sur la base des caractéristiques des asques, des ascospores et des conidies ; *D. iberica* possède des asques plus courtes et plus massues, des ascospores qui la caractérisent et qui rétrécissent vers le fond, et en moyenne, des conidies qui sont légèrement plus longs.

Les résultats obtenus grâce au test de pathogénicité nous laisse suggérer que *D. corticola* est probablement l'espèce la plus impliquée dans l'étiologie du dépérissement du chêne (principalement sur *Quercus suber*) en Algérie. Ce test a montré aussi que *D. corticola* était significativement plus agressive sur les branches de chêne que *B. dothidea* avec des nécroses plus prononcées chez la première.

Ceci est cohérent avec les études sur la sensibilité des chênes méditerranéens à l'infection par différents agents pathogènes [169].

La différence d'agressivité observée entre les souches de champignons peut être due à différentes causes : la variabilité de la virulence des souches, la variabilité du matériel végétal utilisé pour les tests, les méthodes d'inoculation, la durée de l'expérimentation, etc... [130], [170],

Les résultats recueillis grâce à ce travail nous ont permis de caractériser quelques agents pathogènes impliqués dans les dépérissements du chêne en Algérie ; ce travail reste préliminaire, comparé aux travaux qui doivent être effectués afin de mieux comprendre ces écosystème forestiers et bien définir les relations plante-agent fongique qui existent afin de protéger et de préserver nos forêts.

CONCLUSION

Le travail présenté dans ce mémoire a pour objectif principal la connaissance des agents fongiques appartenant à la famille des *Botryosphaeriaceae* qui sont associés au dépérissement enregistré sur deux espèces de chêne (*Quercus suber* et *Quercus ilex*) en Algérie et essayer de mettre la lumière sur les différents symptômes externes et internes enregistrés lors de notre échantillonnage.

Notre expérimentation s'est déroulée dans quatre parcs nationaux qui présentent une biodiversité floristique remarquable, notamment en espèces appartenant au genre *Quercus*.

Afin de répondre à nos objectifs, nous avons procédé à un échantillonnage touchant 67 arbres différents présentant les symptômes externes typiques du dépérissement du chêne ; l'étude des différentes nécroses du bois nous a mené à mettre en évidence la coexistence de plusieurs agents pathogènes dans un même arbre malade ; au total 200 isolats fongiques ont pu être établis à l'aide des méthodes d'isolement du laboratoire de microbiologie de l'université Nova de Lisboa.

La caractérisation morphologique étant à elle seule insuffisante, nous avons alors adopté lors de notre travail les différentes techniques moléculaires pour une meilleure identification des agents fongiques.

L'analyse phylogénétique après séquençages de 28 isolats a pu démontrer l'existence de trois espèces appartenant à trois genres différents où nous avons remarqué que *Diplodia corticola* s'est montrée dominante avec un total de 18 isolats.

Les résultats obtenus à l'aide du test de pathogénicité ont montré que les deux espèces (*D. corticola* et *Botryosphaeria dothidea*) sont pathogènes sur chêne ; il est à signaler que *D. corticola* était significativement plus virulente que *B. dothidea*, et que *Quercus ilex* est moins sensible à ces agents pathogènes que *Quercus suber* ; *Dothiorella iberica* a été exclue de cette étude car la sporulation de ce champignon n'a pas eu lieu.

Dans le but d'une meilleure compréhension du dépérissement du chêne en Algérie, il serait nécessaire de mener plus d'enquêtes à ce sujet et étudier plus de paramètres biotiques et abiotiques dans ces milieux forestiers ; l'amplification de plus de gènes permettra de mieux caractériser ces espèces pathogènes et comprendre les différentes interactions qui existent au sein de cette mycoflore mais aussi entre ces agents et leurs milieux ainsi que leurs plantes hôtes. A l'heure actuelle, les bonnes pratiques sylvicoles restent obligatoires afin de ralentir la progression de ces pathogènes qui menacent la biodiversité floristique de nos forêts, notamment sur chêne.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Dahmani H, 1997- *Contribution à l'étude des groupements du chêne vert Quercus rotundifolia Lamk. Des monts de Tlemcen (ouest algérien). Approche phytoécologique et phytosociologique*. Thèse Doct. D'état, U.S.T.H.B., 238p 34.
2. Natividade J.V., 1956 - *Subericulture*. ED Française de l'ouvrage Portugais subériculture E.N.E.F. (Nancy), 303p.
3. Benseghir L.A ; 2002. *Amélioration des techniques de production hors-sol du chêne-liège: conteneurs-substrats-nutrition minérale*. Mémoire de magistère. Université de Annaba. 150p.
4. Adouane M, 2008: *Etat mycorhizien du chêne-liège (Quercus suber L.) et influence des acacia et eucalyptus sur son développement dans la région d'El-Kala (cas du Canton Boumalek)*. Mémoire d'Ingénieur en Ecologie et Environnement. Université de Annaba. 123p.
5. El Aanry Tazi S., Abourouh M., et Aafi A., 2008 - *Etat des connaissances scientifiques sur les subéraies : bilan et perspectives*. Ann. Rech. For. Maroc. Tome spécial 39 : pp. 9-18.
6. Aime S., 1976 – *Contribution à l'étude écologique du chêne-liège. Etude de quelques Limites*. Thèse Doc de spécialité, univ de Nice, France, 180 p.
7. Belhocine latifa. 2013 - *Les champignons associés au Playopus clylndrus Fab. (Coleopetra, Curculionidae, Platypodinae) dans un jeune peuplement de chêne-liège de la forpet de M'sila (Oran, nord-ouest de l'Algérie): Etude particulière de la biologie et l'épidémiologie de l'insecte*. Thèse Doc, univ de Tlemcen, Algérie, 201p.
8. Aifm, 2006- Synthèse du Séminaire « *Vitalité des peuplements de chêne-liège et chêne vert : situation actuelle, état des connaissances et actions à entre- prendre* » Évora, Portugal 25-26 Oct. 2006
9. Cantat R et Biazzetta R., 2005 - *La levée de liège*. Institut méditerranéen de liège.
10. Zeraïa L., 1982 - *Le chêne liège : phytosociologie, édaphologie, régénération et productivité*. Alger : Institut National de la Recherche Forestière. 159 p.
11. Piazzetta R., 2005 - *La levée du liège, guide technique et de vulgarisation, institut méditerranéen du liège*. 23p.

12. Ouelmouhoub S, 2005 - Gestion multi-usage et conservation du patrimoine forestier : cas des subéraies du Parc National d'El Kala (Algérie). Série « *Master of Science* » n°78.
13. Anonyme, (2006a)- Séminaire "*vitalité des peuplements de chêne-liège et chêne vert : situation actuelle, état des connaissances et actions à entreprendre "Atelier "vers la conception d'un programme intégré de recherche pour promouvoir l'amélioration et la restauration des forêts de chêne-liège et de chêne vert"* Evora, Portugal.
14. Bouhraoua R T., 2003 - *Situation sanitaire de quelques forêts de chêne-liège de l'Ouest algérien : étude particulière des problèmes posés par les insectes*, thèse d'état, département de foresterie, faculté des sciences, université de Tlemcen. 178p.
15. Yalaoui M., 2000 – *La production du liège brute*. Colloque de chêne liège, 15 et 16 Juin 2000- France.
16. Yessad S.A., 2000 - Le chêne-liège et le chêne dans les pays du méditerrané occidental. *Edition ASBL foret Wallonne*. 190P.
17. Pervillé, G., 2003: Atlas de la guerre d'Algérie de la conquête à l'indépendance. *Atlas Mémoires*. Librairie Ravy. 63p.
18. Boudy P., (1952) – *Guide du forestier en Afrique du Nord Paris, Maison rustique*, 509 p.
19. Cobra J., 2000 – Le future de chêne liège, la réalité présente et les incertitude de demain. *Colloque de chêne liège*, 15 et 16 Juin 2000- France.
20. Apcor, 2009: *APCOR year book*. Guide. 83p
21. Anonyme, 1978 - *Monographies forestières*, Institut de technologie forestière de Batna. 78p
22. Chaabna S,2012- *Etude des facteurs de dépérissement du chêne-liège (Quercus suber L .). Etat sanitaire des subéraies du Nord-Est algérien*. Thèse Mag. D'état, Univ. Badji Mokhtar. Annaba., 125p
23. Fraval A., 1991 : Contribution à la connaissance des rythmes de floraison du chêne-liège en forêt de Mamora. *Ann. Rech. For. Maroc*, 25 : 102-118.
24. Seigue A. 1985 - *La forêt circumméditerranéenne et ses problèmes*. *Maisonneuve et Larose, France*, 67-81
25. Margot P., 2006 - Du chêne-liège au bouchon, "*Partie 1 : Histoire et géographie*", Cepdivin.org, consulté le <http://www.cepdivin.org/articles/phmargot015/01.html>

26. Zeraia L., 1981 - *Essai d'interprétation comparative des données écologiques, phénologiques, et productions subéro-ligneuse dans les forêts de chêne liège de provenance cristallines (France méridionale) et d'Algérie*. Thèse de doctorat en Science, 200p.
27. Berrahoumi N., and Regato P., 2008 - *Les subéraies: l'univers cache du chêne liège, une ressource de richesse pour la nature et les hommes*, pp. 8-14
28. Zine M ; 1992 - Situation et perspectives d'avenir du liège en Algérie. Actes du colloque « des (*Quercus suber* L.) en Algérie. *La forêt algérienne*, 3, 5-9.
29. Michaud H; Toumi L; Lumaret R; Li TX, Romane F; Di Giusto F., 1995 - Effects of geographical discontinuity on genetic variation in *Quercus ilex* L. (holm oak): Evidence from enzyme polymorphism. *Heredity*, 74, 590-606.
30. Dahmani, M., 1984. *Contribution à l'étude des groupements du chêne vert des Monts de Tlemcen. Ouest algérien*.
31. Boudy P., 1950 - Économie forestière Nord-africaine. Monographie et traitement des essences forestières. Larose. Paris.525 p.
32. Letreuch Belarouci, N., 1991. *Les reboisements en Algérie et leur perspective d'avenir*. Volume .I. OPU. Alger .294p
33. Maire R., 1926 – *Note phytogéographique de l'Algérie et de la Tunisie avec une carte* / Alger.
34. Kadik, L., 2002.- *Cartes d'occupation des terres des zones forestières et préforestières du semi-aride algérien*. CRSTRA.INCT.
35. Parde L., 1937 – *Les feuillus* .Ed. *Maison Rustique*, Paris, 380p
36. Jacquot C., 1038 – *Le chêne vert*. Ed Herman et Cie., Paris, 74p
37. Belabbas Z., 2007 – *Etude de la ponte de Lymantria dispar (Lepidopera, Lymantriidae) sur le chêne vert et sur le cèdre de l'Atlas, dans le Parc National de chréa*. Thèse ing. Inst. Nat. Agro., El-Harrach, 88p
38. Kaziaoual N., 1982. *Etude phénologique de chêne vert (Quercus ilex L) dans le massif d'Elhassasna (W. de Saida)*. Mem. D'Ing. INA d'Elharach, 90p.
39. Benia F., 2010 – *Étude de la faune entomologique associée au chêne vert (Quercus ilex L.) dans la forêt de Tafat (Sétif, Nord-Est d'Algérie) et bio-écologie des espèces les plus représentatives*. Thèse Doct. D'Etat. Agro., Univ. Ferhat Abbas. Agro., Setif, 229 p.
40. Girardet, P., 1980.- *Chêne vert (Quercus ilex)*. Bull. Vulg. Ed.C.A.V.I.F. (Secrétariat d'état aux forêts et à la mise en valeur des terres).Alger. 6p.

41. Somon, E., 1987.- *Arbres, Arbustes et Arbrisseaux d'Algérie*. Ed.O.P.U.143p.
42. Le Coeur, C., Amat, J. P., Dorize, L. & Gautier, E., 1996.- *Eléments de géographie physique*. Coll. Grand Amphi. Breal: 416p.
43. Nasrallah Y., 1992 – *Etude de la variabilité intra et inter-provenances chez le chêne vert Quercus ilex L. en Algérie*. Thèse Mag. Agro., Inst. Nat. Agro., El-Harrach, 101 p.
44. Dahmani-Megrerouche, M., 2002.- Typologie et chênaies vertes en Algérie. *Forêt méditerranéenne*. XXIII (2) :p15.
45. Barry, J.P., Celles, J.C. & Faurel, L., 1976.- Carte internationale du tapis végétal et des conditions écologiques.Feuilles d'Alger,. *Soc.Hist.Nat.d'Afrique du Nord.Alger*.
46. Sauvage, C., 1961. - *Flore des suberaies marocaines (Catalogue des Cryptogames vasculaires et des Phanérogames)*. Trav.Inst. Sci.Cherif. Bot., pp. 22- 252.
47. Zine El Abidine, 2003. *Le dépérissement des forêts au Maroc : analyse des causes et stratégie de lutte*. Sécheresse 14 (4). John Libbey Eurotext. Pp. 209-218.
48. Badraoui M et Assali F, 2007. *Les changements climatiques : ont-ils des impacts sur le dépérissement du cèdre dans le Moyen Atlas? Résumé de la communication a la célébration de la journée mondiale 2007 de la terre « changements climatiques et impacte écologiques et économiques*. Université Al Khawayn Ifran, 27 Avril 2007. 3p.
49. Manion P, 1981. *Forest decline concept. An overview*. In. Manion P, Lachance D, Éd. *Forest decline concept*. Minnesita : PDS Press, 1992 . Pp : 90-181.
50. Ciesla W.M, 1993. *Qu'arrive-t-il au Neem sahélien ? Unasyuva. N°172 : sécurité des ouvriers forestiers*. Archives des documents de la F.A.O. Département des forêts.62p.
51. Fiot J-L., Caroulle F. et Lucas S., 2007. *Dépérissement et mortalité de quelques essences*. L'IF. N° 16, 3° trimestre.
52. Requardt A., Köhl M., Schuck A., Poker J., Janse G., Masvar R., et Päivinen R., 2007. *Feasibility study on means of combating forest dieback in the European Union*. EC DG ENV Contract, Brussels, Belgium, pp. 79 + Annex I, II, III.
53. Boutte B., 2007. *Les dépérissements observés sont-ils tous dus au changement climatique? Journées d'études << Changements climatiques et forêt méditerranéenne>>*. *Forêt Méditerranéenne*.

54. Lanier L., Joly P. et Bellemer A., et al. 1976. *Mycologie et pathologie forestières*. Tome II. Pathologie forestière. Edition Masson. Paris. Pp.16-26.
55. Dehane B., 2012.- *Incidence de l'état sanitaire des arbres de chêne liège sur les accroissement annuels et la qualité du liège de deux subéraies oranaises : M'sila (Oran) et Zariéffet (Tlemcen)* . Thèse.Doc.Univ.Tlemcen. 363 p.
56. Ait-Amara L et Harrache A, 2008. *Contribution a l'étude d'inventaire des insectes xylophages et leurs impactes sur le dépérissement du cèdre de l'atlas cas de la cédraie du parc national de Belezma- Batna- Thé*. Dép. Biologie . Université Mouloud Maammeri Tizi ousou. 85p.
57. Messaoudene M., (2000)- réflexion sur la structure des peuplements de chêne-liège en Algérie. *La forêt Algérienne* n° 3, pp. 5-9.
58. Dajoz, R., 1980.- *Ecologie des Insectes forestiers*.Ed. Gauthier-Villars.489p.
59. Villemant C., Fraval A. (ed.), 1991. *La faune du Chêne-liège*. Coll. Doc. sci. techn., Actes Editions, Rabat, 336 p.
60. Heim R., (1965)- *Champignon d'Europe*. Ed. Bondée. Net Cie, Paris ; pp. 155-158.
61. Varela M., (2004)- *Le chêne-liège et les incendies de forets*. E.F.N, Portugal (Poste de forêt national).
62. Seigue, A., 1987. - *La flore méditerranéenne française. Aménagement et protection contre les incendies*. EDISUD, Aix en Provence. 159 p.
63. Benia, F., Bounechada, M. & Khelil, M.A., 2004.- Le chêne vert (*Quercus ilex* L.) et ses ravageurs dans la région de Sétif (Nord- Est Algérien). *Integrated Protection in Oak Forests*. IOBC.Bull. 28 (8):111-112.
64. Malençon, G. & Marion, J., 1951.- *Un parasite des suberaies Nord-Africaines, Hypoxylon mediterraeum (D.Ntrs)* ; et Ntrs- Rev. For. Fr. 11 :pp. 682-686.
65. Idjer, G., Chaibdraa, F. & Lounaci, Z., 2004.- *Rapport de mission effectué au niveau des wilayates de Sétif et Oum el Bouaghi*, INRF, Bainem, Alger. 5p.
66. Phillips A.J.L., Alves A., Abdollahzadeh J. , Slippers B. , Wingfield M.J. , Groenewald J.Z. , and CROUS P.W. – 2013., The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture., *Studies in Mycology* 76: 51–167
67. Sinclair, W. A.; Lyon, H.H.; Johnson, W.T. (1987), *Diseases of trees and shrubs*, Cornell University Press, Ithaca, New York, 575 p.

68. Arx JA von, Müller E (1954). Die Gattungen der amersporen Pyrenomyceten. *Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz* 11 (1): pp. 1–434.
69. Arx JA von, Müller E (1975). A re-evaluation of the bitunicate ascomycetes with keys to families and genera. *Studies in Mycology* 9: 1–159.
70. Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN (1995). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*, 8th Edition. CAB International, Wallingford.
71. Eriksson OE (1981). The families of bitunicate ascomycetes. *Opera Botanica* 60: pp. 1–220.
72. Sivanesan A (1984). *The bitunicate Ascomycetes and their anamorphs*. Vaduz, Liechtenstein: J Cramer.
73. Barr ME (1987). *Prodromus to class Loculoascomycetes*. Published by the author, Amherst, Massachusetts, USA.
74. Phillips AJL, Alves A, Pennycook SR, Johnston PR, Ramaley A, et al. (2008). Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the *Botryosphaeriaceae*. *Persoonia* 21: pp. 29–55.
75. Liu J-K, Phookamsak R, Doilom M, Wikee S, Li Y-M, et al. (2012). Towards a natural classification of Botryosphaeriales. *Fungal Diversity* 57: pp. 149–210.
76. Smith H; Wingfield, M.J.; Crous, P.W.; Coutinho, T.A. (1996), *Sphaeropsis sapinea and Botryosphaeria dothidea endophytic in Pinus spp. and Eucalyptus spp. in South Africa*, *South African Journal of Botany*, Elsevier, the Netherlands, vol. 62, pp. 86–88.
77. Ciesla, W.M.; Diekmann, M.; Putter, C.A.J. (1996), *Eucalyptus spp.*, *FAO/IPGRI technical guidelines for the safe movement of germplasm*, FAO/IPGRI, Rome, Italy, vol. 17, 58p.
78. Theissen F, Sydow H (1918). Vorentwürfe zu den Pseudosphaeriales. *Annales Mycologici* 16: pp. 1–34.
79. Anonyme -2013., *Mycobank*, <http://www.mycobank.org>, consultée en mai 2013.
80. Ismail A.M., Cirvilleri G., Lombard L., Crous P.W., Groenewald J.Z. and Polizzi G. – 2013,. characterisation of *neofusicoccum* species causing mango dieback in italy,. *Journal of Plant Pathology* (2013), 95 (3), pp. 549-557
81. Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, Rheeder J, Marasas WFO, et al. (2006). Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in Mycology* 55: 235–253.

82. Bush, E.A. *Botryosphaeria* canker and dieback of trees and shrubs in the landscape. 2009. *Virginia Cooperative Extension Report* 450–726. <http://pubs.ext.vt.edu/450/450-726/450-726.html>.
83. Phillips A.J.L., Alves A., Correia A. and Luque J., 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia* 97: pp. 513–529.
84. Harrington T.C. & Rizzo, D.M. (1999) *Defining species in the fungi. Chapitre 3 dans Structure and Dynamics of Fungal Populations*. Édité par Worrall, J.J. Kluwer Press, Dordrecht. Pages 43-71.
85. Cracraft, J. (2000) *Introduction: Species Concepts in Theoretical and Applied Biology: A Systematic Debate with Conséquences. Chapitre 1 dans : Species Concepts and Phylogenetic Theory : A Debate*. Édité par Wheeler, Q.D. & Meier, R. New York, Columbia University Press. pp. 3-17.
86. Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Krokene, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S. & Fisher, M.C. (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genét. Biol.* 31 : 21-32.
87. Kohn, L.M. (2005) Mechanisms of fungal speciation. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43 : 279- 308.
88. Berbee, L. M. & Taylor, J.W. (1992b) Convergence in ascospore discharge mechanism among pyrenomycete fungi based on 18S ribosomal RNA gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1 : pp. 59-71.
89. Hausner, G., Reid, J., & Klassen, G.R. (1992) Do galeateascospore members of the Cephalosporaceae, Endomycetaceae and Ophiostomataceae share a common phylogeny?. *Mycologia.* 84: pp. 870-881.
90. Wingfield, B.D., Grant, W.S., Wolfaardt, J.F., and Wingfield., M.J. (1994) *Ribosomal RNA sequence phylogeny is not congruent with ascospore morphology among species in Ceratocystis sensu stricto*. *Mol. Biol. Evol.* 11: pp. 376-383.
91. Seifert, K.A. & Samuels, G.J. (2000) How should we look at anamorphs? *Stud. Mycol.* 45 : pp. 5-18.
92. Jacobs, K. & Wingfield, M.J. (2001) *Leptographium species. Tree pathogens, insect associates, and agent of blue-stain*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 207 p.
93. Mayr, E. (2000) *The Biological Species Concept. Chapitre 2 dans Species Concepts and Phylogenetic Theory : A Debate*. Édité par Wheeler, Q.D. & Meier, R. Columbia University Press. New-York, USA. pp. 17-29.

94. Kronstad, J.W. & Staben, C. (1997) *Mating type in filamentous fungi*. *Ann. Rev. Genét.* 31 : pp. 245-276.
95. Harrington, T.C, McNew, D., Steimel, J., Hofstra, D. & Farrell, R. (2001) Phylogeny and taxonomy of the *Ophiostoma piceae* complex and the Dutch elm disease fungi. *Mycologia*. 93 : pp. 111-136.
96. Loppnau, P., & Breuil, C. (2003) Species level identification of conifer associated *Ceratocystis* sapstain fungi by PCR-RFLP on a P-tubulin gène fragment. *FEMS Microbiol. Lett.* 222 : pp. 143-147.
97. Sites, J.W.Jr & Marshall, J.C. (2003) Dehmiting species : a renaissance issue in systematic biology. *Trends Ecol. Evol.* 18 : pp. 462-470.
98. Kim, J.-J., Lim, Y.W., Seifert, K.A., Kim, S.H., Breuil, C. & Kim, G.-H. (2005) Taxonomy of *Ophiostoma radiaticola* sp. nov. (Ophiostomatales, Ascomycetes), the teleomorph of *Pesotum pini*, isolated from logs of *Pinus radiata*. *Mycotaxon*. 91 :pp. 481-496.
99. D.G.F., 2009: *Statistiques des produits forestiers*. Min. Agri., Alger, 1p.
100. Anonyme 2006b Direction Générale des Forêts Parc national de Théniet El Had - Mars 2006.
101. D.G.F., 2006: *Station des produits forestiers*. Min Agri., Alger, 1p
102. Letreuch A., Medjahdi B., Belarouci N. & Benabdeli K. -2009- Diversité floristique des subéraies du parc national de Tlemcen (Algérie)- *Acta Botanica Malacitana* 34p.
103. Bellatrech M., 2008 – *Diversité fonctionnelle comparée de l'entomofaune dans deux chenaies dans le parc national de Chréa*. Thèse Ing., univ Saad Dahleb. Agro., Blida, 91p.
104. Abdessemed K., 1981- *Le cèdre de l'Atlas (Cedrus atlantica Manetti) dans le massif des Aurès et de Bélezma : étude phytosociologique, problème de conservation et d'aménagement*. Thèse doct. Ing., Fac. St. Jérôme, Marseille. 199 p.
105. P.N.T.–2009- Plan de gestion (2006-2010)- *rapport du ministère de l'agriculture et du développement rural (M.A.D.R.)*.
106. 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: pp. 515- 523.
107. Berraf A. et Péros J.P., 2005. Importance de l'eutypiose et de l'esca en Algérie et structure de la communauté fongique associée. *Journal International des Sciences de la vigne et du vin* 39. 3, pp. 121–128.

108. Urbez-Torres J. R., Peduto. F, Striegler R. K., Urrea Romero K. E., Rupe J. C., Cartwright R. D. and Gubler W. D. 2011b. Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. *Fungal Diversity*.
109. Henriques, J. (2014) – *Charcoal canker (Biscogniauxia mediterranea) in cork oak decline in Portugal*. Tese apresentada para obtenção de grau de Doutor em Engenharia Florestal e dos Recursos Naturais, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, 124 p.
110. Zang R, Huang L. 2007. Study on the pycnidiospore germination of apple tree Valsa canker pathogen. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica* 16(1):64–67.
111. Santos J.M. and Phillips A.J.L., 2009. Resolving the complex of Diaporthe (Phomopsis) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal. *Fungal Diversity* 34: pp. 111–125.
112. Berraf A., 2013 - *Dynamique spatio-temporelle de l'eutypiose et l'esca de la vigne dans le sahel algérois. Taxonomie et phylogénie des agents pathogènes associés*. Thèse. Doc. Agro., Inst. Nat., El Harrach, 235p.
113. Carbone I. and Kohn L.M., 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: pp. 553-556.
114. White T.J., Bruns T., Lee S. and Taylor J., 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR Protocols, A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315–322
115. Alves A., Henriques I., Fragoeiro S., Santos C., Phillips A. J. L. and Correia A., 2004. Applicability of rep-PCR genomic fingerprinting to molecular discrimination of members of the genera *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella*. *Plant Pathology*, 53, pp. 629–634.
116. Hall T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: pp. 95–98.
117. Altschul S.F., Gish W., Miller E.W. and Lipman D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, pp. 403–410.
118. Damm, U., Crous, P. and Fourie, P. 2007. Botryosphaeriaceae as potential pathogens of *Prunus* species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia* 99: pp. 664-680.
119. Wu M., and Eisen J. A., 2008. A simple, fast, and accurate method of phylogenomic inference. *Genome Biol*.

120. Swofford D.L., 2003. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods)*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
121. Gramaje D., Armengol J., Mohammadi H. and Mostert L., 2009. Novel Phaeoacremonium species associated with Petri disease and esca of grapevine in Iran and Spain. *Mycologia*, 101 : pp. 920–929.
122. Chen S. F., Pavlic D., Roux J., Slippers B., Xieb Y. J., Wingfield M. J. and Zhou X. D. 2011. Characterization of *Botryosphaeriaceae* from plantation-grown Eucalyptus species in South China. *Plant Pathology*: 10.1111/j. pp. 1365-3059.
123. Trouillas, F. P., Pitt W.M., Sosnowski M.R., Huang R., Peduto F., Loschiavo A., Scott E.S. and Gubler, W. D. 2011. Taxonomy and DNA phylogeny of Diatrypaceae associated with Vitis vinifera and other woody plants in Australia. *Fungal Diversity*.
124. Hillis DM. and Bull JJ. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42: pp. 182–192.
125. Cunningham, C.W. 1997. Can three incongruence tests predict when data should be combined? *Molecular Biology and Evolution* 14: 733–740.
126. Barker, F.K., Lutzoni, F.M. 2002. The utility of the Incongruence Length Difference test. *Systematic Biology* 51: pp. 625–637.
127. Page R.D.M., 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12 : pp. 357–358.
128. Rayner RW. 1970. *A mycological color chart*. Commonwealth Mycological Institute and British Mycological Society, Kew, Surrey, United Kingdom.
129. Carlucci A, Raimondo ML, Cibelli F, Phillips A. J.L. and Lops F., 2013 - Pleurostomophora richardsiae, Neofusicoccum parvum and Phaeoacremonium aleophilum associated with a decline of olives in southern Italy., *Phytopathologia Mediterranea* (2013) 52, 3, pp. 517–527
130. Luque J., Martos M., Aroca A., Raposo R. and Garcia-Figueres F., 2009. Symptoms and fungi associated with declining mature grapevine plants in northeast Spain. *Journal of Plant Pathology* 91: pp. 381–390.
131. 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, 238p.

132. Hewitt W. B., 1957. Some manifestations of black measles of grapevines. *Phytopathology*, 47p.
133. French, D.W. and W.C. Stienstra, 1980. Oak Wilt. Extension Folder 310 - Revised 1980. *Agricultural Extension Service*, University of Minnesota. 6 p.
134. Sosnowski M., Creaser M., Wicks T., Lardner R., Scott E., 2005. Unlocking the secrets of seasonal variation in eutypa dieback symptoms. Annual Technical issue. *pests & disease management. The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker*. pp. 7-12.
135. Larignon P. and Dubos B., 1997. Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 103: pp. 147–157.
136. Péros J.P., Berger G. and Jamaux-Despreaux I., 2008. Symptoms, wood lesions and fungi associated with esca in organic vineyards in Languedoc-Rousillon (France). *Journal of Phytopathology* 156: pp. 297–303.
137. Mugnai L., Graniti A. and Surico G., 1999. Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevine. *Plant Disease* 83: pp. 404–416.
138. Ferriera J.H.S., Wyk P.S.van and 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.*, 20, 2, pp. 43-46.
139. Brasier CM. 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. *Environmental constraints including climate change*.
140. Luque, J., Sierra, D., Torres, E., and Garcia, F. 2006. *Cryptovalsa ampelina* on grapevines in N.E. Spain: Identification and pathogenicity. *Phytopathol. Mediterr.* 45: pp. 101-109.
141. Frisullo S, Camele I, Carlucci A, Lops F. 2000. Micromiceti dei generi *Botryosphaeria* e affini su querce deperienti in Puglia e Basilicata. *Petria* 10:pp. 1–10.
142. Sanchez ME, Venegas J, Romero MA, Phillips AJL, Trapero A, 2003. *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in southwestern Spain. *Plant Disease* 87: pp. 1515–1521

143. Romero MA, Sanchez JE, Jiminez JJ, Belbahri L, Trapero A, Lefort F, Sanchez ME. 2007. New *Pythium* taxa causing root rot on Mediterranean *Quercus* species in southwest Spain and Portugal. *J Phytopathol* 155: pp. 289–295.
144. Maddau L, Perrone C, Andolfi A, Spanu E, Linaldeddu BT, Evidente A. 2011. Phytotoxins produced by the oak pathogen *Discula quercina*. *For Pathol* 41: pp. 85–89.
145. Luque J, Cohen M, Save R, Biel C, Alvarez IF. 1999. Effects of three fungal pathogens on water relations, chlorophyll fluorescence and growth of *Quercus suber* L. *Ann For Sci* 56: pp. 19–26
146. Frisullo S, Camele I, Carlucci A, Lops F. 2000. Micromiceti dei generi *Botryosphaeria* e affini su querce deperienti in Puglia e Basilicata. *Petria* 10: pp. 1–10.
147. Evidente A, Maddau L, Spanu E, Franceschini A, Lazzaroni S, Motta A. 2003. Diplopyrone, a new phytotoxic tetrahydropyranpyran-2-one produced by *Diplodia mutila*, a fungus pathogen of cork oak. *J Nat Prod* 66: pp. 313–315.
148. Paoletti E, Anselmi N, Franceschini A. 2007. Pre-exposure to ozone predisposes oak leaves to attacks by *Diplodia corticola* and *Biscogniauxia mediterranea*. *Sci World Journal* 7: pp. 222–230.
149. Alves A; Correia A; Luque J; Phillips A.J.L. (2004a), *Botryosphaeria corticola*, sp. nov. on *Quercus* species, with notes and description of *Botryosphaeria stevensii* and its anamorph *Diplodia mutila*, *Mycologia*, Mycological Society of America, USA, vol.96, pp. 598–613.
150. Luque , J., and Gibral, J. 1989. Dieback of cork oak (*Quercus suber*) in catalonia (NE Spain) caused by *Botryosphaeria stevensii*. *Eur. J. For. Pathol.* 19: pp.7-13.
151. Bakry M, Abourouh M. 1996. Nouvelles données sur le développement du Cheêne-liège (*Quercus suber* L.) au Maroc. *Ann Rech For Maroc* 29: pp.24–39.
152. Slippers B. and M.J. Wingfield, 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21, pp.90–106.

153. Luque, J.; Parladé, J.; Pera, J. (2000), Pathogenicity of fungi isolated from *Quercus suber* in Catalonia (NE Spain), *Forest Pathology*, Blackwell Publishing, Germany, vol.30, pp. 247-263.
154. El-Badri, N.; Abadie, M. (2000), Observations on the dynamic of *Diplodia mutila* Fr. Apud Mont. development on the cork-oak, *Quercus suber* L. in Morocco, *Cryptogam Mycol.*, vol. 21, pp. 235-248.
155. Vajna, L.; Schwarczinger, I. (1998), *Fungi causing branch dieback of giant sequoia* [*Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) Buchholzci] in Hungary, Noveenyvedelem, Agroinform Kiado Es Nyomda Kft, Hungary, vol. 32, no. 2, pp. 133-136.
156. Slippers B., and Wingfield M.J., 2007a. *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21: pp.90–106.
157. Slippers, B.; Crous, P.W.; Denman, S.; Coutinho, T.A.; Wingfield, B.D.; Wingfield, M.J. (2004a.), Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*, *Mycologia*, Mycological Society of America, USA, vol. 96, pp. 83–101.
158. Burgess T.; Wingfield M. J. (2002), Impact of fungi in natural forest ecosystems; A focus on *Eucalyptus*, In: Sivasithamparam, K.; Dixon, K.W.; Barrett, R.L. (eds.) *Microorganisms in plant conservation and biodiversity*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 285–306.
159. Sutton, T. B. (1990), White rot, In: Jones, A. L.; H. S. Aldwinckle, H.S. (eds.) Compendium of apple and pear diseases, *The American Phytopathological Society*, St. Paul, MN, pp. 16-18.
160. Wang, J.L.; He, W.; Qui, G.F.; Tao, W.Q.; Zhao, J.; Tian, S. (2007), Study on the anamorph and species of *Botryosphaeria*, the important pathogen of tree's canker, *Forest Research*, Beijing, vol. 20, pp. 21-28.
161. Liang, J; Jiang J; Liu, H (2005), Study on the pathology of poplar canker pathogen interaction in China, *Forest Research*, Beijing, vol.18, pp. 214–221.
162. Grasso, F.M.; Granata, G. (2010), First report of *Botryosphaeria dothidea* associated with dieback of aspen (*Populus tremula*) in Italy, *New Disease Reports*, BSPP, vol.20, no.28.

163. Phillips, A.J.L. (2000), *Botryosphaeria populi* sp. nov. and its *Fusicoccum* anamorph from poplar trees in Portugal, *Mycotaxon*, Mycotaxon Ltd., USA, vol. 76, pp.135- 401.
164. Abdollahzadeh J., A. Javadi, R. Zare and A.J.L. Phillips, 2014. A phylogenetic study of *Dothiorella* and *Spencermartinsia* species associated with woody plants in Iran, New Zealand, Portugal and Spain. *Persoonia* 32, pp. 1–12.
165. Phillips A.J.L., A. Alves, J. Abdollahzadeh, B. Slippers, M.J. Wingfield, J.Z. Groenewald and P.W. Crous, 2013. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Studies in Mycology* 76, pp. 51–167.
166. Alves A., C. Barradas, A.J.L. Phillips and A. Correia, 2013. Diversity of *Botryosphaeriaceae* species associated with conifers in Portugal. *European Journal of Plant Pathology* 135, pp. 791–804.
167. Azouaoui-Idjer G, Della Rocca G, Pecchioli A, Bouznad Z, Danti R. (2012). First report of *Botryosphaeria iberica* associated with dieback and tree mortality of Monterey cypress (*Cupressus macrocarpa*) in Algeria. *Plant Disease* 96: 1073p.
168. Baskarathevan J, Jaspers MV, Ridgway HJ, Eirian Jones E. (2012). Incidence and distribution of botryosphaeriaceous species in New Zealand vineyards. *European Journal of Plant Pathology* 132: pp.549–560
169. Linaldeddu BT, Franceschini A, Luque J, Phillips AJL. 2007. First report of canker disease caused by *Botryosphaeria parva* on cork oak trees in Italy. *Plant Dis*, pp. 91:324.
170. Úrbez-Torres, J.R., Leavitt, G.M., Voegel, T.M. and Gubler, W.D. 2006. Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease* 90 (12): pp. 1490- 1503.

APPENDICE A**Liste des abréviations**

LSU :	the large subunit
ITS :	Internal
Pb :	Paire de bases
MP :	Maximum de parcimonie
NJ :	Neighbour-Joining
µm :	Micro mètre
nm	Nanomètre
ng	Nanogramme

APPENDICE B
MILIEUX DE CULTURES

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Jonsthorpe et Booth , 1983)

Pomme de terre 200g.

Dextrose 20g.

Agar 15g.

Eau distillée 1000ml.

PH=7, autoclavage 20 minutes à 120°C.