

UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Jean GRENTE

**LES VARIANTS HYPOVIRULENTS
DE L'*ENDOTHIA PARASITICA*
ET LA LUTTE BIOLOGIQUE
CONTRE LE CHANCRE DU CHATAIGNIER**

LABORATOIRE DE BIOLOGIE VEGETALE

FACULTE DES SCIENCES
6, Avenue Victor Le Gorgeu
29283 BREST Cedex

Juillet 1981

Série C
N° d'ordre : 69
N° de série : 19

T H E S E

présentée

A L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Unité d'Enseignement et de Recherche
Sciences Exactes et Naturelles
pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

Jean GRENTE

LES VARIANTS HYPOVIRULENTS DE L'*ENDOTHIA PARASITICA*
ET LA LUTTE BIOLOGIQUE
CONTRE LE CHANCRE DU CHATAIGNIER

Soutenue le 3 juillet 1981 devant la commission d'examen

Président : Professeur Mireille MOREAU, Université de Bretagne Occidentale

Rapporteurs : Professeur Peter DAY, Université de CAMBRIDGE, U.K.
Professeur Jean-Jacques CLERET, Université de Bretagne Occidentale

Examineurs : Docteur André CAUDERON, Membre de l'Institut,
Inspecteur Général de l'Agriculture
Professeur François MANGENOT, Université de NANCY

UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Liste des Directeurs de Thèses en Sciences pour l'année 1980 - 1981

Professeur de classe exceptionnelle : JOHANNIN Pierre (Physique)

Professeurs de première classe :

BOCLE Jean (Mathématiques)	LE FLOCH Jean (Physique)
QUERRE Julien (Mathématiques)	GUERCHAIS Emile (Chimie)
MOREAU Mireille (Biologie)	MORABIN Armand (Physique)
PERESSE Joseph (Physique)	STURTZ Georges (Chimie)
SAUMAGNE Pierre (Chimie)	JOHANNIN Andrée (Physique)
COURTOT Jacqueline (Chimie)	PEYRAUD Claude (Biologie)
COURTOT Pierre (Chimie)	GUGLIELMETTI Robert (Chimie)
	BABIN Claude (Géologie)

Professeurs de deuxième classe :

LAHAYE Jacqueline (Biologie)	BOURGEOIS Claude (Biologie)
CHEZE Claude (Physique)	BILLIET Yves (Chimie)
GENIN Robert (Physique)	PY Bernard (Physique)
BERTHE Guy (Mathématiques)	QUEMENER Jean-Jacques (Physique)
GENIN Jeannine (Physique)	GODET-THOBIE Christiane (Mathématiques)
PENOT Michel (Biologie)	MORFIN Robert (Biologie)
LUCAS Albert (Biologie)	MICHEL Pierre (Mathématiques)
PUJARNISCLE Serge (Biologie)	CALVEZ Léon (Physique)
SAVARY Gérard (Physique)	CHEZE Geneviève (Biologie)
GRAVELLE Michel (Géologie)	BLANCHET René (Géologie)
GLEMAREC Michel (Biologie)	LLOZE René (Biologie)
BROISE Michel (Mathématiques)	DERRIENNIC Yves (Mathématiques)
PELHATE Joseph (Biologie)	MAURY René (Géologie)
LAURANSAN Jacques (Chimie)	VELLY Jean-Paul (Physique)
BOUVIER Pierre (Physique)	CALVES Jean-Yves (Chimie)
COUDEVILLE Henri (Physique)	LE DEMEZET Maurice (Chimie)
CLERET Jean-Jacques (Biologie)	TUFFIN Firmin (Physique)
CARVALLO Michel (Mathématiques)	PASCAL Georges (Physique)

Maîtres de Recherche au C.N.R.S. :

MOREAU Claude (Biologie)	CHAURIS Louis (Géologie)
--------------------------	--------------------------

Professeurs de la Faculté de Médecine en Sciences Biologiques :

Professeurs titulaires :

FLOCH Hervé (Biochimie)	RIVIERE Marcel (Histologie)
-------------------------	-----------------------------

Professeurs sans chaire :

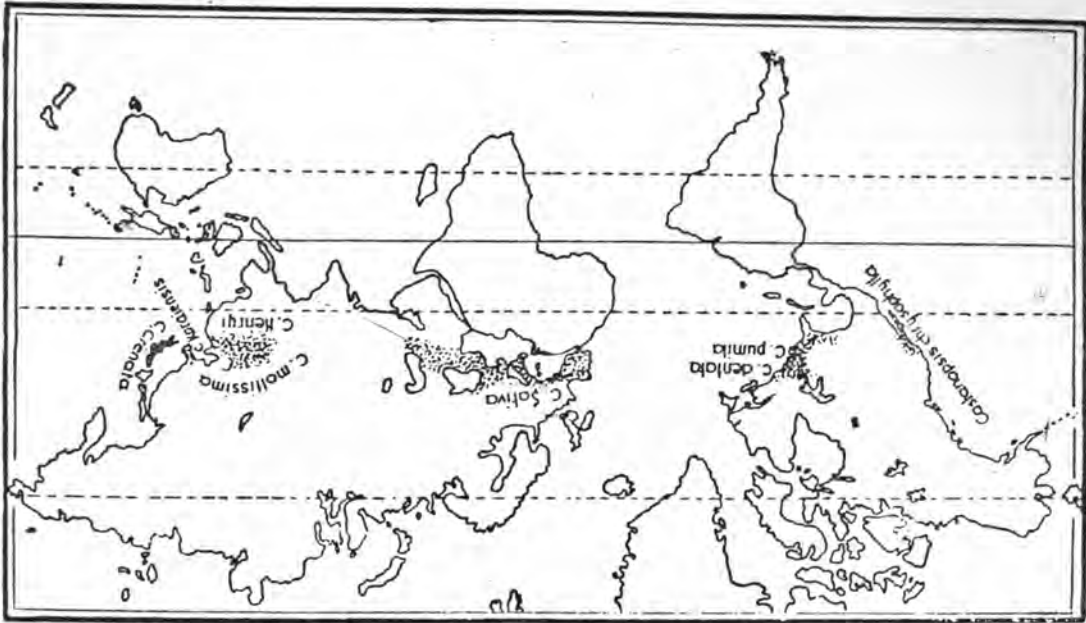
MORIN Pierre (Biophysique)	BARTHELEMY Lucien (Physiologie)
BARDOU Louis (Biochimie)	CHASTEL Claude (Bactériologie)

SOMMAIRE

=====

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : MATERIEL ET TECHNIQUES.....	12
A/ Matériel	13
Le châtaignier européen.....	13
<u>L'Endothia parasitica</u>	25
B/ Techniques.....	39
CHAPITRE II : ETUDE COMPARATIVE DE DEUX FORMES D'EVOLUTION DU CHANCRE.	59
A/ Le chancre à <u>Endothia</u> et son évolution normale.....	60
B/ La cicatrisation spontanée des chancres.....	69
C/ Les souches " B ".....	75
Conclusions.....	82
CHAPITRE III : PROPRIETE DES SOUCHES " B ".....	87
A/ Etude comparée des souches " N " et " B ".....	87
B/ Le caractère transmissible de la morphologie " B ".....	101
C/ Conditions de l'interaction.....	113
Conclusions.....	123

CHAPITRE IV : APPROCHE DU DETERMINISME DE L'HYPOVIRULENCE	128
A/ Ségrégation végétative à partir de spores uninucléées	128
Première génération	128
Génération ultérieures	133
B/ Confrontation du type "JR" avec le type "N"	136
C/ Etude des propriétés des diverses souches	137
Souches concernées	137
Résultats	138
Discussion et conclusions	148
CHAPITRE V : LUTTE BIOLOGIQUE ET EPIDEMIOLOGIE	151
A/ La lutte biologique	151
Généralités	151
Principes de l'application	153
Modalités pratiques	155
B/ Epidémiologie de l'hypovirulence	157
Méthodologie provisoire	159
La notation des chancres	162
Etat actuel du travail	165
DISCUSSION GENERALE	177
CONCLUSIONS GENERALES	187
BIBLIOGRAPHIE	191



DISTRIBUTION DU GENRE CASTANEA



Un bel exemplaire de *C. sativa*

INTRODUCTION

Le Centre de Recherches Agronomiques de CLERMONT-FERRAND regroupe un certain nombre d'équipes de chercheurs de l'I.N.R.A. (Institut National de la Recherche agronomique), bien souvent confrontés avec les problèmes de l'agriculture de montagne et de demi-montagne.

Chargé depuis 1950 des recherches phytopathologiques au sein de ce Centre, nous avons consacré plus de trente années à l'étude des moyens à mettre en oeuvre pour sauvegarder la présence et la culture du châtaignier en France, tâche de synthèse agronomique à base essentiellement phytopathologique, puisque cet arbre est gravement menacé par deux maladies (l'Encre et le Chancre) particulièrement graves et destructrices.



L'introduction en France de l'Endothia parasitica (chancre de l'écorce), dont la présence fut détectée en 1956, était un événement prévu depuis 1950 dès le début de nos travaux. Nous avons donc mis en place depuis 1951 un travail prévisionnel d'épreuve de la résistance de clones et d'écotypes, en collaboration avec nos collègues chargés de la sélection de types nouveaux de porte-greffes et de variétés greffées de châtaignes et de marrons.

La découverte des premiers foyers de maladie en France en 1959 fut l'origine de travaux de recherche, d'expérimentation et d'application. La castanéculture française était confrontée avec un grave problème de survie. Le chancre de l'écorce est en effet la plus grave des maladies qui ait jamais attaqué une espèce ligneuse.

Historique résumé de la maladie
=====

Le chancre de l'écorce du châtaignier est une maladie des organes aériens due à un champignon ascomycète parasite : l'Endothia parasitica.

Figure 1
Epidémie de l'Endothia
Aux U.S.A. (Gravatt 1946)

- Aire du *C. dentata*
-  Zone d'attaque à 50-90%
- Limites décennales de l'extension
-  Aire de châtaigniers sporadiques

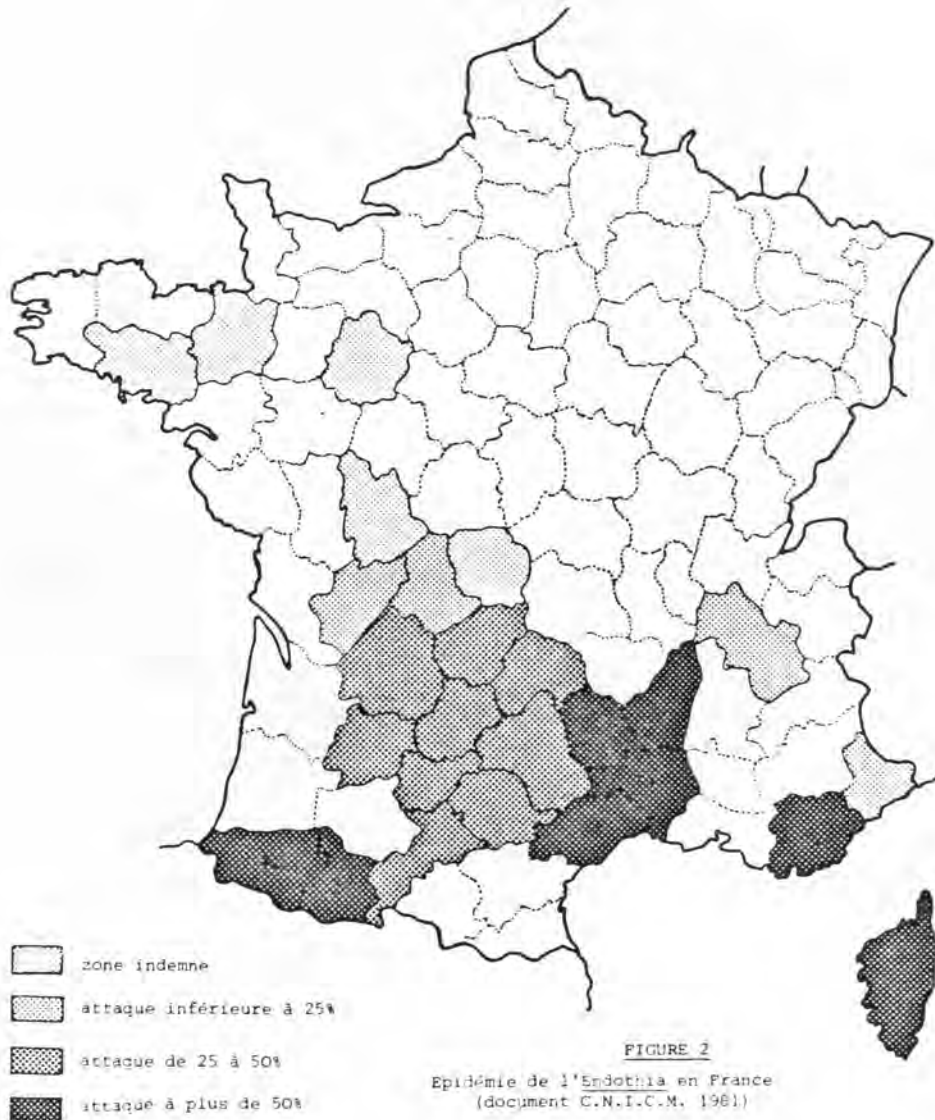
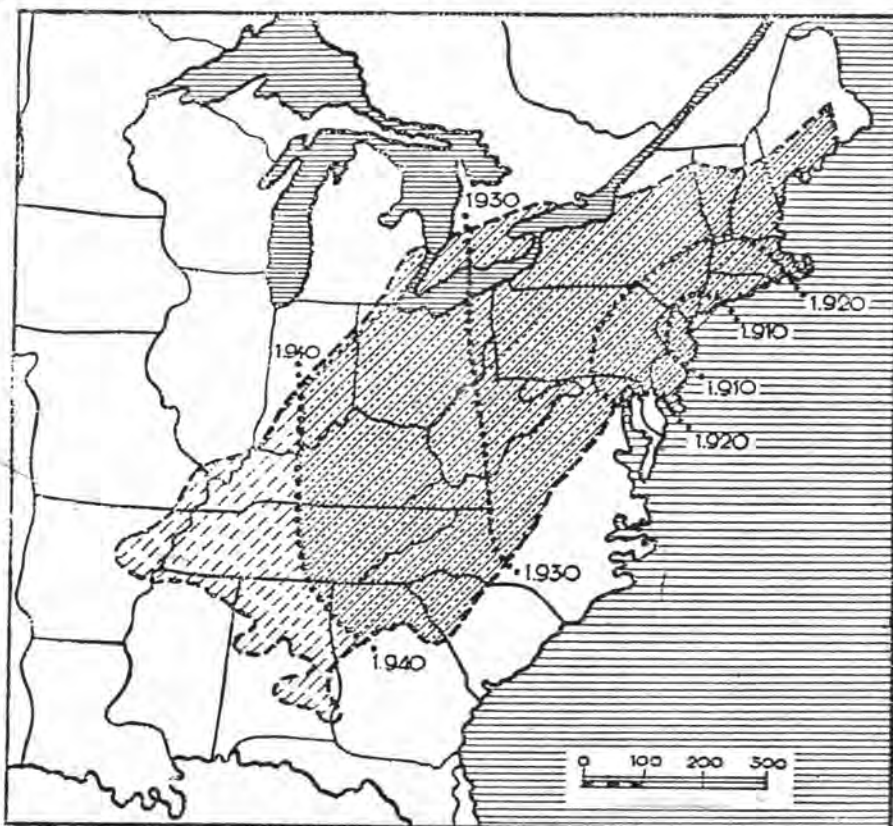


FIGURE 2
Epidémie de l'Endothia en France
(document C.N.I.C.M. 1961)

Son origine semble se situer en Extrême-Orient : Japon et Corée, où elle peut provoquer la mort des branches des Castanea crenata dans les zones où l'arbre souffre du froid (zones d'altitude de Corée, île de Hokaïdo au Japon). Dans les conditions ordinaires de culture, les dégâts sont très réduits et seuls les arbres en état de malnutrition ou attaqués par divers parasites et prédateurs secondaires peuvent en souffrir. Sur les sujets en bon état nous avons pu constater la présence du champignon localisé dans les portions externes de l'écorce, sans qu'aucune action pathogène ne puisse être décelée (GRENTE 1979).

Il est impossible de dater l'apparition de la maladie en Extrême-Orient, elle est réputée pour exister à l'état endémique depuis des temps très reculés (MEYER 1913 FAIRCHILD 1913 SHEAR & Al.1917).

Avant 1904 elle n'existait pas aux Etats-Unis d'Amérique ni en Europe. Sa découverte dans le parc du jardin zoologique du Bronx à New-York marque le début de la plus grave épidémie ayant jamais affecté une espèce ligneuse (MERKEL 1905 KULHMAN 1978) (1).

En quelques 25 années elle a envahi toute l'aire d'extension du châtaignier américain (C.dentata) et tué les parties aériennes de tous les arbres (sauf très rares exceptions), sur les 4.000 000 Km2 occupés par l'espèce (le châtaignier représentait 25% des essences feuillues qui constituaient l'immense forêt Est Américaine), malgré les mesures d'éradication sévères mises en oeuvre par les services officiels (METCALF & COLLINS 1909-1911 GRAVATT 1935) - voir figure 1 -.

Actuellement les magnifiques forêts, où des arbres de 20 à 40 mètres de haut et de 2 à 3 mètres de diamètre formaient de belles futaies, ont été envahies par des espèces feuillues et résineuses variées, les châtaigniers réduits à des rejets de souche de 7 à 8 cm de diamètre et de 3 à 4 mètres de haut, régulièrement tués par le chancre quand ils atteignent ces dimensions.

La maladie fut introduite en Italie à la fin de la première guerre mondiale et nous faisons remonter cet événement à la livraison dans le port de GENES de bois de mines en provenance des U.S.A.(1917). Les premières attaques furent décrites 21 ans plus tard, en 1938; les dégâts occasionnés dans l'ensemble de la châtaigneraie italienne étaient déjà considérables, le chancre contribuait à la régression de la production de fruits (80% entre 1938 et 1948) qui devait sévir jusqu'en 1970-75.

(1) On admet qu'elle fut introduite par des plants d'Extrême-Orient.

Pour l'Espagne, les avis diffèrent. Pour ELORRIETA(1949), une attaque en 1947 dans la province de VISCAYA et GUIPUZCOA, aurait été jugulée par éradication ; mais pour DARPOUX(1950), il existait de nombreux arbres atteints à proximité de la frontière avec le Pays Basque français (1).

Nos inquiétudes en 1956, étaient donc justifiées, d'autant que selon nos enquêtes, la maladie devait exister depuis 1946 dans le Massif des Maures ainsi que dans l'Ardèche. Lors de sa découverte, son extension était déjà considérable, atteignant plusieurs milliers d'arbres.

L'administration du Ministère de l'Agriculture avait décidé l'éradication, ce qui était impossible à réaliser et de nature à entraîner la disparition du châtaignier et de la castanéculture. Connaissant l'inefficacité de cette méthode, nous avons fait renoncer à ces projets et appliquer une méthode de lutte par curetage qui fut poursuivie pendant six années consécutives dans les zones atteintes, avec un succès relatif (seules étaient efficacement protégées les plantations fruitières entretenues).

Depuis 1958 la maladie s'est développée dans toutes les zones castanéicoles françaises à vocation fruitière, à l'exception (actuellement) de la région Bretonne. Si l'attaque est très ancienne dans les départements du Sud-Est, elle est plus récente dans le Centre et la châtaigneraie de Dordogne nous semble constituer le front d'attaque actuel de l'épidémie dans sa progression vers le nord-ouest (carte N°2).

Moyens de lutte =====

Avant la mise en application de la méthode de lutte biologique qui fait l'objet de ce mémoire, les seules mesures directes consistaient dans l'éradication par abattage et incinération des arbres atteints, le curetage des lésions et l'excision des organes atteints (la loi de 1921 rend obligatoire l'éradication sur l'ensemble du territoire français). La lutte préventive par sélection de matériel végétal résistant fait l'objet de recherches en France, Suisse, Italie, Espagne, U.S.A.

(1) Le rapport de LAPORTE signalant la maladie en 1925 dans le département de l'Aude ne peut être pris en considération, (le parasite n'a pas été identifié de façon certaine).

Historique des recherches sur l'hypovirulence

=====

Nos recherches sur les variants d'Endothia parasitica, le phénomène d'hypovirulence et la lutte biologique qui en est issue, ont pour origine une préoccupation du groupe des experts forestiers européens dans le cadre de la F.A.O. En 1964 cet organisme, fortement intrigué par la découverte de cicatrises spontanées généralisées en Italie (BIRAGHI 1950,1954), demandait aux diverses nations castanéicoles européennes une étude sur place de ces phénomènes si originaux.

En effet, les phytopathologistes italiens ne présentaient d'autre explication aux guérisons spontanées qu'une hypothétique résistance acquise à la suite des mutilations infligées à l'arbre (par les coupes successives que les cultivateurs étaient obligés d'effectuer pour éliminer les parties mortes). Ils en étaient même venus à se demander si ce phénomène de résistance acquise n'était pas devenu héréditaire, tant les faits observés paraissaient étranges (généralisation des guérisons sur des plants de semis).

Nous avons participé aux travaux du groupe et choisi d'étudier l'hypothèse de l'intervention d'un hyperparasite.

Les premiers résultats devaient nous faire entrevoir une voie légèrement différente mais entièrement nouvelle. Notre souci d'agronome fut de concevoir très tôt une méthode de lutte utilisant les phénomènes que nous venions de mettre en évidence, elle fut adoptée en 1975 par le Ministère de l'Agriculture et nous avons dû mettre en place toute une organisation complexe pour l'application dans toute la châtaigneraie française.

L'expérimentation, les perfectionnements, devaient nous conduire à des recherches assez variées qui ne constituent pas un travail exhaustif. Certains aspects cependant peuvent former un ensemble cohérent, nous les avons regroupés dans ce mémoire dont l'objet est d'exposer les bases biologiques de la méthode, ses principes, ses développements, ses résultats. Notre propos est aussi de montrer comment une analyse scientifique de faits d'observation peut permettre la solution d'un problème agronomique complexe et de souligner que l'agronome peut, dans certains cas, tirer parti de phénomènes naturels sans avoir recours à aucun artifice, simplement en déviant légèrement les équilibres naturels.

Nous exposerons successivement :

- la mise en évidence de formes particulières du parasite liées à la cicatrisation.

- l'étude de leurs propriétés pathogènes comparativement à celles des formes normales, d'où est issue la notion d'hypovirulence.

- une approche assez timide des déterminismes de l'hypovirulence.

- un début d'étude épidémiologique des résultats de la méthode de lutte biologique.

Bien d'autres travaux, sur la biologie de la maladie et sur l'hypovirulence, ont été effectués au cours des 28 années que nous avons consacrées partiellement à l'étude du châtaignier et de la castanéculture; nous ne pouvons tous les présenter ici mais nous y ferons allusion dans la discussion des résultats.

L'importance du châtaignier pour l'équilibre agro-sylvo-pastoral, le maintien des populations rurales de montagne, la protection du sol et de l'environnement, est de beaucoup supérieure à l'image qu'en donne l'importance économique de ses produits (fruits et bois).

A lui seul, cet aspect justifie qu'on puisse porter des efforts à la solution du problème ; mais il y a plus :

La lutte par l'hypovirulence, qui fait l'objet de ce mémoire, est probablement un modèle pour d'autres méthodes biologiques qui pourraient être extrêmement intéressantes sous condition que les recherches nécessaires soient entreprises par des spécialistes compétents.

Notre contribution est avant tout un travail d'application, la partie purement scientifique a été limitée à l'acquisition des données indispensables à la conception d'une méthode de lutte.

Orientation du travail.

=====

L'orientation du travail pour le futur ouvre plusieurs voies de recherche :

- l'étude des mécanismes et des vecteurs de dispersion de la maladie est un point d'épidémiologie qui serait très utile pour parfaire les méthodes de lutte.

- élucider les mécanismes qui, à l'échelon physiologique et biochimique, diminuent les capacités pathogènes du parasite revêtirait un intérêt primordial pour tenter de trouver des méthodes de lutte analogues contre d'autres pathogènes.

- préciser le déterminisme de l'hypovirulence à l'échelon cellulaire serait une ambition légitime pour une équipe de chercheurs fondamentalistes; ce n'est probablement qu'à ce prix qu'on pourra généraliser la méthode.

- approfondir l'étude génétique du champignon pourrait conduire à la sélection de souches hypovirulentes plus performantes et capables d'enrayer encore plus rapidement l'épidémie débutante dans les nouvelles régions menacées (nous pensons à la Bretagne).

- une meilleure connaissance des relations hôte-parasite comparativement pour les deux formes du champignon, éclairerait certainement les mécanismes de défense des plantes vis-à-vis de leurs parasites.

Avec des connaissances plus approfondies, il serait possible de mettre au point des méthodes de lutte par hypovirulence contagieuse contre d'autres agents pathogènes; c'est ce que nous souhaitons aux phytopathologistes qui conduiront les recherches beaucoup plus loin que nous n'avons su le faire.

Nous restons persuadé que les méthodes biologiques de lutte représentent une solution d'avenir parce qu'elles utilisent de façon harmonieuse les mécanismes naturels, les orientent au profit de l'homme sans les brusquer, accélèrent les évolutions naturelles, permettant à la plante de souffrir moins de la phase nocive de l'évolution des maladies.

REMERCIEMENTS

Nous devons une reconnaissance toute particulière à :

Madame le Professeur MOREAU.

Sans elle, ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Dans la masse de travaux que nous lui avons présentés, elle a su tirer l'essentiel, le significatif, et nous indiquer comment construire ce travail de synthèse.

Son rôle ne s'est pas borné à cette tâche essentielle; depuis plusieurs années elle a conseillé notre travail sur les mécanismes de l'infection chez la plante et de la transmission de l'hypovirulence chez le champignon. Ses conseils nous ont été précieux.

Mais elle a fait encore plus, elle a soutenu notre travail de rédaction par des incitations pressantes et répétées, sachant qu'elles nous étaient indispensables pour mener à bien un travail normalement du ressort de chercheurs plus jeunes. Elle a participé avec persévérance à la rédaction au prix d'efforts considérables, concrétisant ainsi une amitié de plusieurs dizaines d'années au cours desquelles, avec CLAUDE MOREAU, elle nous a souvent apporté son soutien dans les nombreuses péripéties de notre carrière.

Nous ne saurions trop la remercier.

Ce travail est l'oeuvre d'une équipe, d'abord dans le cadre de l'I.N.R.A., que nous devons remercier pour avoir laissé se dérouler des recherches contestées en leur temps par la communauté des phytopathologistes, puis dans le cadre du Comité National Interprofessionnel de la Châtaigne et du Marron :

En tout premier lieu, ma plus ancienne collaboratrice, Suzanne BERTHELAY-SAURET a oeuvré depuis 1954 à mes côtés; sa compétence et sa grande habileté pour manipuler les matériels vivants les plus délicats comme les techniques les plus complexes, son don d'observation, son esprit critique sûr m'ont été du plus grand secours. Travailleuse assidue aussi bien au laboratoire qu'au champ d'essai, elle a assuré une masse de travail considérable, des milliers de semis monospores, d'inoculations, de confrontations, d'observations. Elle fut la cheville ouvrière de ce travail.

Pour un agronome avide de réalisations pratiques, l'aide de Madame HEBRARD fut précieuse pour construire le laboratoire d'application de la lutte biologique; sa minutie et la rigueur de son travail étaient indispensables pour passer du domaine du laboratoire à celui de l'application pratique sur le terrain.

Par la suite, Melle VROT a apporté son sens de l'organisation, son autorité, ses connaissances scientifiques au fonctionnement du service de lutte biologique; par son travail soutenu elle a permis à la lutte de se concrétiser. D'abord, elle a aidé à résoudre le problème de la production de l'inoculum en fermenteurs, puis a apporté une contribution décisive au contrôle des résultats, à la constitution des fichiers de données et à leur exploitation informatique.

Au nombre des collaborateurs de ce travail, nous devons faire une place toute particulière à notre épouse, qui non seulement assume avec bonheur la lourde charge de l'administration du laboratoire de lutte biologique, mais a aussi assuré la dactylographie et la présentation de ce rapport, tâche pénible et ardue. Nous devons aussi lui rendre un hommage particulier car le temps que nous avons consacré à la construction du laboratoire a été pris sur celui que nous devions lui consacrer.

A notre collègue André CAUDERON, nous devons une reconnaissance spéciale pour nous avoir soutenu dans notre carrière à l'I.N.R.A. en des moments particulièrement pénibles, pour avoir accepté de nous accorder

un peu de son temps précieux et fait bénéficier de ses immenses connaissances de biologiste et d'agronome, concrétisant ainsi une amitié de longue date.

A Monsieur le Professeur CLERET, nous devons des remerciements pour nous avoir conseillé au sujet de l'étude statistique de l'épidémiologie et surtout pour avoir su réveiller en nous une vieille soif pour les délices de la pratique des mathématiques. Nous ne saurions trop le prier de nous excuser d'un aussi piètre travail: l'analyse statistique n'en est qu'à ses premiers balbutiements; notre souhait est qu'il accepte de continuer de nous apporter son aide pour la suite!

De Monsieur le Professeur MANGENOT, nous avons reçu à plusieurs reprises des encouragements et de précieux conseils dans différents domaines de la recherche. L'intérêt qu'il a porté à notre laboratoire a toujours été réel; il nous a même donné l'occasion de recruter une de ses meilleures élèves Mlle VROT pour animer le laboratoire du C.N.I.C.M. Aujourd'hui, il a accepté de faire partie de ce jury, qu'il trouve ici l'expression de nos remerciements chaleureux.

A Monsieur Elysée DUMAS, Président fondateur du Comité National Interprofessionnel de la Châtaigne et du Marron, nous devons une reconnaissance particulière pour le soutien qu'il nous a apporté dans la tâche difficile de faire passer un travail depuis le laboratoire jusqu'à la pratique agricole, et surtout pour avoir fait adopter la méthode de lutte biologique par le Ministère de l'Agriculture, pour avoir su organiser l'action professionnelle pour que la lutte biologique devienne la réalité quotidienne.

Dans les rapports avec la pratique, nous devons avoir garde de ne pas oublier tous les techniciens de l'I.N.R.A. et du C.N.I.C.M., les stagiaires, les collègues, qui nous ont assisté. Une mention spéciale sera pour l'agriculteur qui nous a ouvert ses châtaigneraies pour les premières introductions de souches hypovirulentes, Monsieur Pierre PERRIN ; il a su expérimenter d'abord, puis grouper autour de lui ses amis pour créer le premier noyau de châtaigneraie traitée; Monsieur Rémi LONJON a fait à cette occasion un travail remarquable. Qu'ils trouvent tous l'expression de notre grande gratitude.

Monsieur le Professeur Peter DAY a joué dans ce travail un rôle tout particulier. Alors qu'il était le chef de file des chercheurs américains qui, au Connecticut Agricultural Experiment Station, étudiaient le châtaignier et ses maladies, il a, le premier, compris l'importance du phénomène d'hypovirulence et a entrepris la vérification de nos expériences. Il a pu confirmer la partie la plus importante de notre travail et la publication de ses résultats a rompu le scepticisme affiché par les chercheurs européens. Il a suscité aux U.S.A. l'intérêt de plusieurs équipes pour une application de l'hypovirulence; ce mouvement a été à l'origine du Chestnut Symposium de Morgantown en 1978. En cette occasion, il nous a reçu dans son laboratoire, nous a efficacement recommandé auprès des autres équipes de recherche, et accueilli avec la plus grande hospitalité pour tout notre séjour dans sa famille. Nous avons instauré avec ses collaborateurs une coopération fructueuse.

Malgré les importantes fonctions qu'il exerce maintenant au PLANT BREEDING INSTITUTE de CAMBRIDGE, il a bien voulu nous faire le très grand honneur d'être parmi nous aujourd'hui.

Nous lui adressons nos remerciements les plus chaleureux.

CHAPITRE I

MATERIEL et TECHNIQUES

A - MATERIEL

LE CHATAIGNIER EUROPEEN

Aire de répartition
Utilisations culturelles
Importance économique
Particularités biologiques
 Différenciation d'organes adventifs
 Formations corticales
Autres espèces
 Résistance aux maladies
 Hybrides

L'ENDOTHIA PARASITICA - SA BIOLOGIE.

Reproduction sexuée ;
Reproduction asexuée ;
Caryologie des pycnospores
Organes de dissémination
Variabilité et notion de "SUCHE"
Caractères culturels du type "Normal"
 Croissance végétative
 Anastomoses
 Formation des pycnides - Photosensibilité
 Secteurs
Influence des conditions de milieu
 Facteurs physiques.
 Facteurs chimiques
Activités métaboliques

B - TECHNIQUES

Milieux de culture
 Milieu au malt
 Milieux de PUHALLA et ANAGNOSTAKIS
 / Milieux à l'amidon de maïs
Confrontation des thalles
 Détermination du Groupe de Compatibilité Végétative
 Transmission de l'hypovirulence
Production des inoculums
 Production d'inoculum en "pellets"
 Production d'inoculum "en pâtes"
Isolement du champignon
 Cas des écorces vivantes
 Cas des écorces desséchées
 Cas des écailles du rhytidome
Semis monospores
Inoculation des arbres
Observation des chancres
Techniques d'analyse statistique
Technique de calcul

MATERIEL et TECHNIQUES

A/ MATERIEL

LE CHATAIGNIER EUROPEEN
=====

Aire de répartition
=====

Le châtaignier européen Castanea sativa Miller, classé par les botanistes dans la famille des Fagacées, est un arbre cultivé depuis si longtemps qu'il est difficile de décider de son indigénat et de délimiter son aire de répartition spontanée.

Comme sa tige souffre souvent des froids hivernaux, même dans le Midi de la France alors que cet accident est rare dans l'Italie du Centre et du Sud, on lui assigne souvent une origine péri-méditerranéenne.

Le genre Castanea comprend une douzaine d'espèces distribuées dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord. La carte (fig. 1) illustre la répartition des quatre espèces les plus importantes et montre le groupement de leurs aires de répartition qui restent distinctes.

En France, il assure la couverture des pieds et des pentes des massifs montagneux non calcaires, jusqu'à une altitude de 1 000 mètres au Sud de son aire et de 400 - 600 mètres au Nord. On peut distinguer sept zones (selon CAMUS 1929) :

1°- le Massif Central où son habitat est concentré ; le châtaignier s'étend sur les bordures Sud du plateau central, avec un diverticule dans les côteaux du Languedoc et du Roussillon.

2°- les Pyrénées de l'Ouest, la concentration maximale étant au Pays Basque.

3°- la région bretonne où sa végétation est particulièrement florissante et à l'abri des aléas climatiques.

4°- la région charentaise et vendéenne, s'étendant jusqu'au Bordelais où son habitat est plus dispersé.



Figure 3 : Rameau et floraison mâle et femelle du châtaignier (CAMUS A., 1929)

- 5°- la zone subalpine où il existe sous forme de taillis mélangés.
- 6°- le massif des Maures où il occupe des pentes d'exposition nord.
- 7°- la Corse où il forme deux massifs très importants qui couvrent tout le centre de l'île.

Sa répartition dans le reste de l'Europe a été décrite par maints auteurs (CAMUS 1929, particulièrement). (1)

Utilisations culturelles

=====

Les utilisations agricoles du châtaignier sont multiples.

Quand le sol et le climat le permettent, on cherche à exploiter son fruit; c'est le cas au sud de la Loire mais avec des productions de valeur très variable selon les cas : la châtaigne (fruit à plusieurs graines) de faible calibre est produite partout mais sa valeur marchande est faible, ne rentabilisant pas toujours les frais de ramassage; le marron (gros fruit à une seule graine, donc qui ne se fragmente pas lors de l'épluchage) n'est produit que dans les départements de la région bretonne, le Gard, l'Ardèche, l'Hérault, le Périgord et le Var, parce que les variétés fruitières sont très exigeantes du point de vue climatique.

Les produits ligneux - bois de toutes catégories - revêtent une importance particulière en Limousin, Périgord et dans les zones d'altitude des autres départements producteurs. Les gros arbres de fûtaie étaient autrefois exploités pour la fabrication des charpentes et la menuiserie. L'exploitation des vieux châtaigniers de grand diamètre pour la production d'extrait tannant a fait disparaître la majorité de ces sujets et actuellement, l'essentiel de la production est assurée par des taillis dont la forme et le type évoluent dans le temps, depuis les "feuillardières" jusqu'aux taillis producteurs de poteaux et de bois de parquetterie. Par suite du dépeuplement des campagnes et surtout des zones de moyenne montagne, le rôle du châtaignier a quelque peu changé. Nous considérons qu'actuellement son intérêt principal, en dehors des régions productrices de fruits de qualité est la protection du sol.

(1) Les figures 3 à 6 illustrent quelques particularités anatomiques et biologiques.

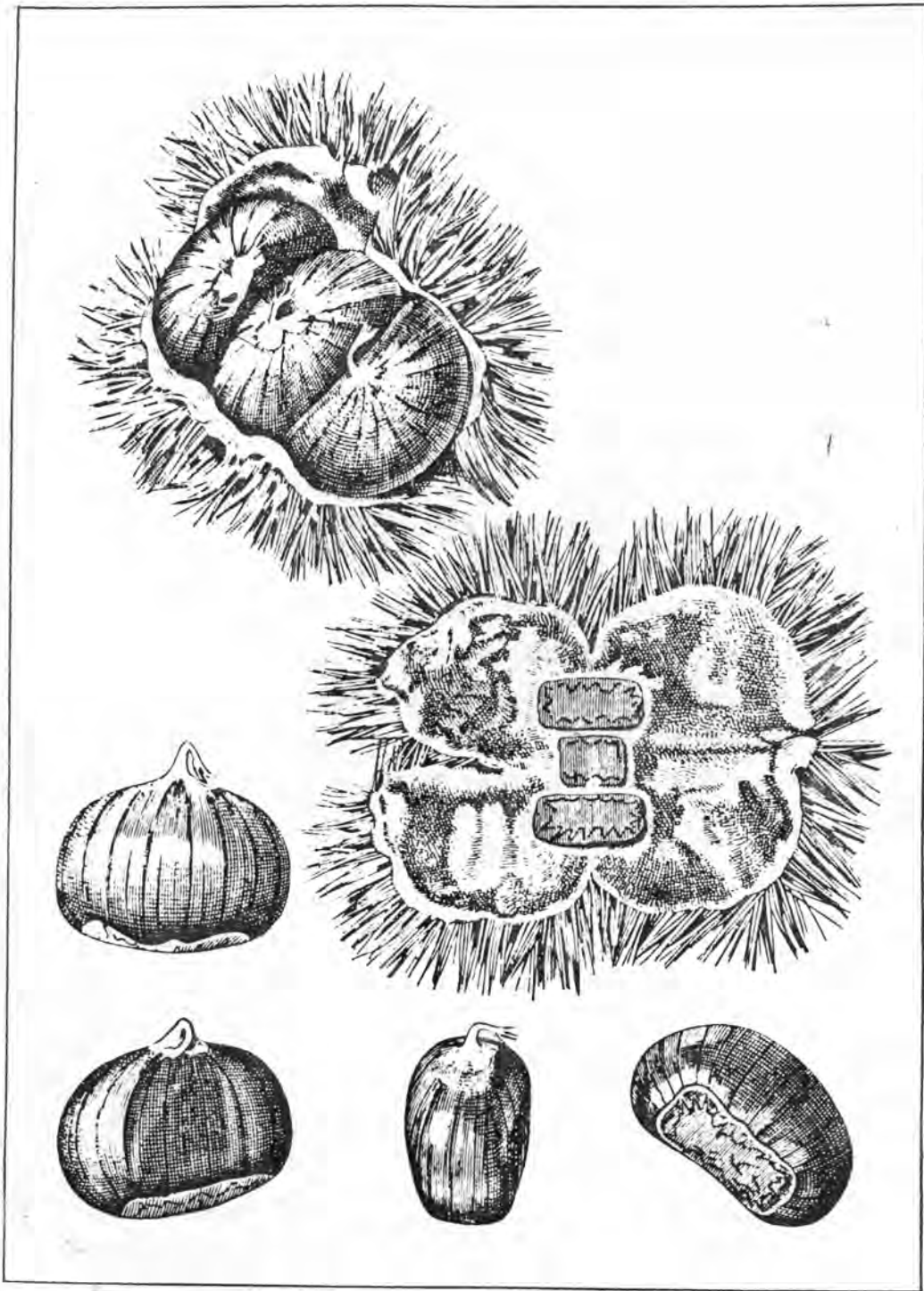


Figure 4 : Fruits du châtaignier : châtaignes, groupées dans la bogue et séparées
-le marron est une châtaigne ne contenant qu'une seule graine - (FENAROLI L., 1945)

Figure 4 : Fruits du châtaignier
châtaignes groupées dans la bogue et séparées
-le marron est une châtaigne ne contenant qu'une seule graine-
(FENAROLI L., 1945)

C'est en effet le seul feuillu permettant la couverture végétale des pentes des massifs cristallins dans des conditions sévères de sécheresse, de vent, d'infertilité du sol, d'alternance de froid et de chaleur et sans recevoir de soins.

Cultivé en massifs à faible densité d'implantation et sous une forme fruitière, son couvert épais est peu favorable à la végétation sous-jacente, il peut ainsi constituer des pare-feux facile à entretenir, donc efficaces; sous forme de taillis à destination plus spécifique de production de bois, ces avantages ne sont plus aussi évidents et la protection contre l'incendie n'est plus assurée.

Importance économique

=====

Dans l'économie des zones de demi-montagne, le châtaignier joue souvent un rôle important par les utilisations très diverses de ses produits : bois, feuilles, fruits, produits accessoires.

Dans certains départements du centre de la France, il lui arrive de participer pour 60% aux ressources de l'exploitation agricole (en dépit d'une dévalorisation continue depuis 50 années).

L'exploitation fruitière des départements spécialisés connaît un renouveau depuis que la concurrence des marrons italiens s'est affaiblie; il s'est créé un mouvement de rénovation soutenu par l'Etat, pour la production de fruits de qualité. En dépit des difficultés techniques considérables, les castanéiculteurs ont réussi à produire une fraction importante des fruits nécessaires aux besoins des industries de transformation.

La France n'en reste pas moins importatrice de marrons pour plus de 70% de ses besoins et la production de ces fruits reste encore de rentabilité incertaine à cause des aléas climatiques et phytopathologiques.

Particularités biologiques

=====

Nous ne mettrons l'accent que sur celles qui présentent un intérêt pour la suite de l'exposé.



Figure 5 : Rejets de C. sativa, sur des souches recépées à plusieurs reprises par suite des attaques d'Endothia. (Région de BUSALLA Italie) Les chancres visibles sur les tiges sont du type cicatriciel.

Différenciation d'organes adventifs

et Facultés de régénération

Sur les vieux arbres, au pied et au point de départ des ramifications du tronc, des pousses feuillues apparaissent tous les ans; tant que le tronc porte des rameaux vigoureux, ces productions ne sont pas vouées à un développement notable, mais lorsque les branches de la partie supérieure viennent à perdre de leur vigueur par suite, soit du gel, soit de l'altération du tronc, elles se développent et assurent la rénovation de la charpente.

Le plus important est le comportement des rejets de la souche. Si le tronc principal est coupé ou si sa végétation est fortement réduite, la souche émet des rejets adventifs sur toute sa périphérie. Ils sont originaires du collet et prennent naissance à 10 - 15 centimètres de profondeur, de préférence sur le pourtour de la souche; leur vigueur est d'autant meilleure que leur localisation est plus périphérique, ce qui tient essentiellement à leur pouvoir d'affranchissement : la base des rejets d'origine profonde émet souvent son propre système racinaire, phénomène qui, à terme, assure le rajeunissement de l'arbre à la fois au niveau des racines et des parties aériennes.

Cette propriété de végétation adventive est très importante parce qu'elle explique la longévité de l'arbre d'une part, et son comportement vis-à-vis des maladies d'autre part.

Les facultés de régénération naturelle contribuent à donner au châtaignier une longévité exceptionnelle. Selon la majorité des auteurs, les arbres millénaires ne manqueraient pas; on cite des exemplaires géants tels le châtaignier dit "de l'Etna" dont le tronc atteignait le diamètre de 18 mètres (sous sa ramure, il pouvait abriter 100 cavaliers avec leur monture et son âge était évalué à 3 000 ans).

Elles expliquent aussi pourquoi le châtaignier n'est pas tué par le chancre de l'écorce. Cette maladie n'attaque pas les organes souterrains mais détruit seulement l'appareil aérien; à partir de la souche, l'arbre reconstitue une charpente qui sera à nouveau détruite par la maladie (voir chapitre II).

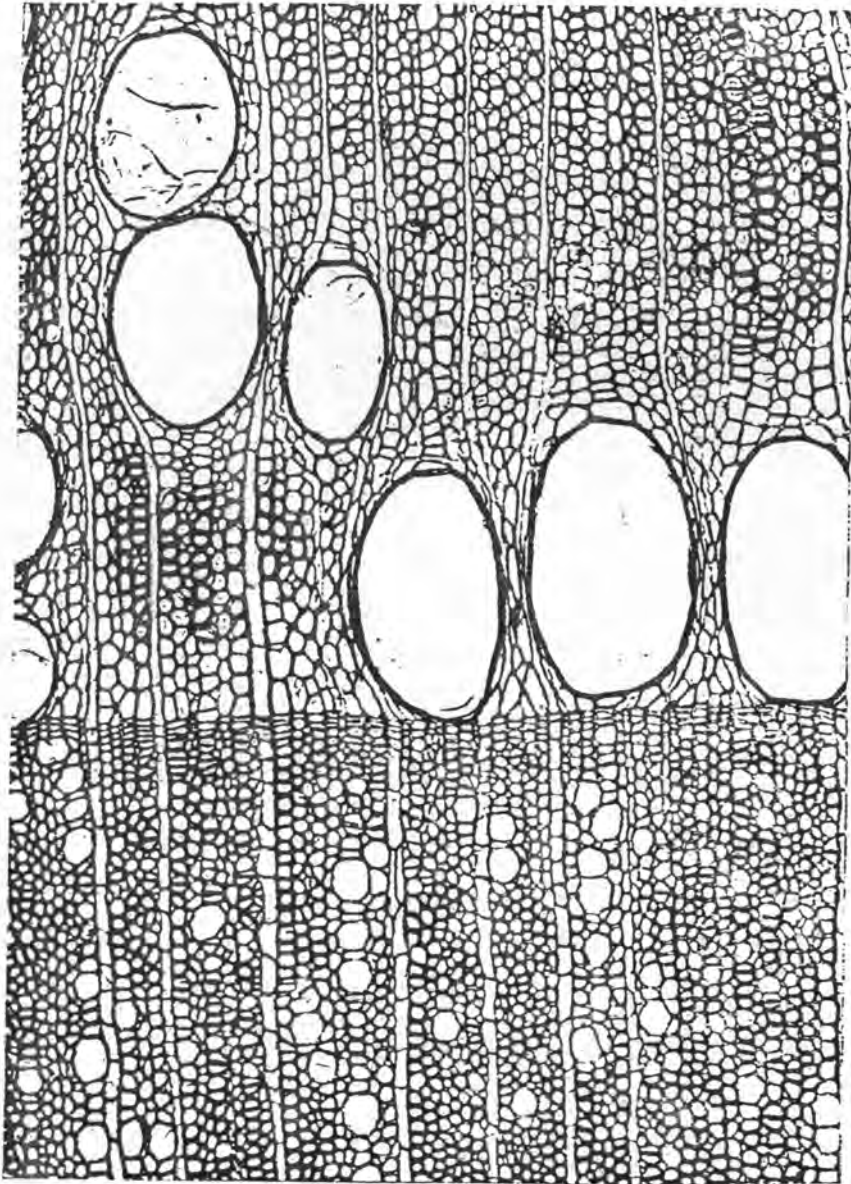


Figure 6 : Coupe dans le bois du châtaignier (selon ELORRIETA J., 1949)

Le pouvoir de régénération de la souche semble presque infini; nous avons observé en Italie des arbres dont l'appareil aérien avait été détruit à dix reprises depuis 1935, sans que la vigueur des rejets ne diminue.

Le ralentissement du flux de sève élaborée provoqué par les chancres favorise le développement de pousses feuillues à leur partie inférieure, autre aspect de cette propension à la régénération.

Par contre, la maladie de l'Encre (due au Phytophthora cinnamomi) qui s'attaque au système racinaire, provoque des dégâts irrémédiables et constitue probablement une des rares causes de la mort de l'arbre.

Formations corticales

Une particularité anatomique du rameau est la formation précoce du péricycle; elle a lieu dès la première année et se compose rapidement de 6 à 8 strates; le liège s'accumule en assises plus nombreuses que celles du phelloderme; les cellules de ce tissu restent à parois minces et se confondent avec celles de l'écorce primaire. Les réactions corticales aux blessures et aux altérations pathologiques sont rapides et intenses, ce qui explique la possibilité de cicatrisation spontanée que nous décrirons dans la suite.

Une autre particularité tient dans la structure du péricycle : il est formé d'un anneau de petites fibres à parois très épaisses se groupant en arcs convexes comprenant des éléments à petite section, réunis par de grosses sclérites dont la taille atteint 80 micromètres (CAMUS 1929). Sous l'influence des altérations de l'écorce, les faisceaux de fibres péricycliques se multiplient et forment plusieurs anneaux concentriques incomplets. Ces formations assurent la protection des tissus sous-jacents.

Autres espèces

=====

Les espèces importantes sont au nombre de quatre, chacune possédant une aire d'extension spécifique.

En plus de Castanea sativa, il faut donc mentionner :

- Castanea dentata Borkhausen, châtaignier américain répandu dans l'Est des Etats-Unis où il formait des forêts denses d'arbres de haute taille et de fort diamètre; il était utilisé surtout pour son bois et, à un moindre titre, pour ses fruits dont la qualité est bonne sans valoir celle de C.sativa.

- Castanea crenata Zieb. et Zucc. ou châtaignier du Japon. C'est un arbre de taille moyenne. Dans son pays d'origine il est cultivé de telle sorte que sa longévité semble limitée (20 ans). Nous avons pu constater qu'introduit en Europe aussi bien qu'en Amérique, il dépasse 80 ans sans signe de sénescence. Dans son habitat, nous l'avons vu souffrir des froids hivernaux mais en France, il s'accommode du climat ardèchois et limousin sans subir de dommages importants. C'est cependant une espèce exigeante sur le plan de la fertilité du sol et surtout de l'alimentation hydrique; il souffre donc de la sécheresse. Ses fruits sont de qualité médiocre.

- Castanea mollissima Blume ou châtaignier chinois est un arbre de petite taille à floraison abondante, produisant des fruits de qualité, très sucrés. Il est encore plus exigeant que le C.crenata pour la fertilité du sol.

Résistance aux maladies

Les deux espèces extrême-orientales ont été introduites en Europe en raison de leur réputation de résistance vis-à-vis du Phytophthora cinnamomi, agent de l'Encre, et de l'Endothia parasitica, agent du Chancre. Très peu de sujets se sont développés correctement, ces espèces étant peu adaptées à nos conditions de milieu.

Bien que sous le contrôle de la physiologie de la plante (tout arbre en arrêt de végétation est sensible; les résistants ont seulement le pouvoir de limiter, en phase active, les lésions contractées pendant la période de dormance), la résistance au Phytophthora cinnamomi de ces deux espèces est un fait désormais bien établi.

Vis-à-vis de l'Endothia, nous avons pu constater au Japon que la résistance du C.crenata est avant tout sous contrôle du climat et que dans les zones froides, elle s'effondre complètement.

Le C.mollissima par contre est considéré comme résistant, mais les essais de comportement dans les conditions de nos châtaigneraies manquent pour juger de la réalité pratique des faits.

Le châtaignier américain se montre d'une très grande sensibilité aux deux parasites, ce qui explique la destruction en 25 ans des 4 000 000 kilomètres carrés de châtaigneraie américaine. Le C.sativa est réputé moins sensible que le châtaignier américain; il nous semble que la différence tient essentiellement en une capacité de réaction corticale plus intense.

Hybrides

Pour minimiser les risques d'introduction de l'Endothia en Europe, depuis 1907 les sélectionneurs français, dans leurs perspectives de lutte contre l'Encre, ont préféré importer d'Extrême-Orient des fruits plutôt que des plants. De plus, ils ont choisi de semer les châtaignes produites en France par les premiers sujets importés. La fécondation croisée étant de règle chez le châtaignier, les plants obtenus par cette méthode étaient des hybrides entre les sujets exotiques et les C.sativa environnants. La gamme des hybrides ainsi produits est immense et tous varient notablement, pour les caractères morphologiques comme physiologiques. Pour ce qui concerne la maladie de l'Encre, les hybrides de première génération sont sensibles (la résistance apparaît comme un caractère récessif); pour le moment, aucune solution satisfaisante n'a été trouvée.

Pour l'Endothia, nous avons participé pendant plusieurs années à un programme de sélection concernant toute une gamme d'écotypes de C.sativa, d'hybrides d'origines diverses, et de quelques spécimens réputés purs des deux types asiatiques. Sur 10.000 arbres éprouvés, 3 hybrides complexes (C.crenata x (C.sativa x C.mollissima)) se sont montrés réellement résistants, mais aucun ne possédait ni les facultés d'adaptation ni les qualités fruitières requises.

La voie de sélection pour la résistance continue d'être explorée par les chercheurs français, helvétiques et américains, mais les perspectives sont assez peu encourageantes (d'autant qu'il faudrait lui associer la résistance à l'Encre, au moins dans le cas des plants à utilisation forestière et des producteurs directs).

L'ENDOTHIA PARASITICA - SA BIOLOGIE.

=====
L'Endothia parasitica (Murr) P.J.& H.W.Anderson est un champignon parasite de la classe des Ascomycètes, ordre des Diaporthales, à mycélium filamenteux, articulé et cloisonné (MURRILL 1906, CLINTON 1912) La caractéristique de l'espèce est de former dans l'écorce atteinte des lames constituées par des hyphes agrégées disposées en "palmettes".

Les organes de fructification se forment dans des stromas subcorticaux colorés par deux pigments (l'un orangé vif : la skyrine, et l'autre jaune : la rugulosine); ils déchirent l'écorce sous laquelle ils se développent et font saillie extérieurement sous forme de pustules ponctiformes (diamètre 0,7 à 3 mm., hauteur 0,5 à 2,5 mm., selon Martha K.RHOANE et R.J.STIPES 1978) -voir figure 7-.

Reproduction sexuée :

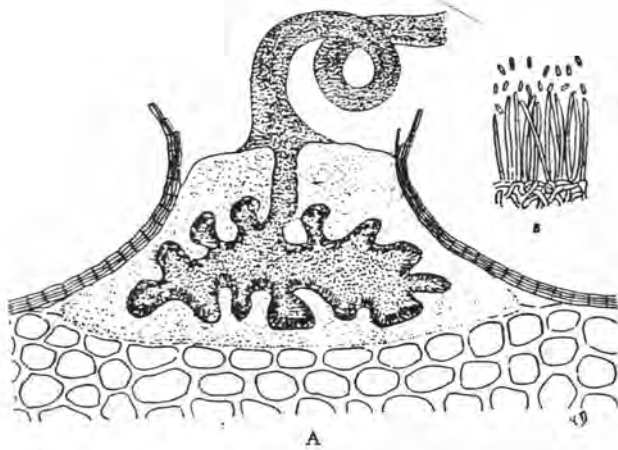
=====

↓ ↓
Les asques sont formés dans un ascocarpe et mêlés à des paraphyses.

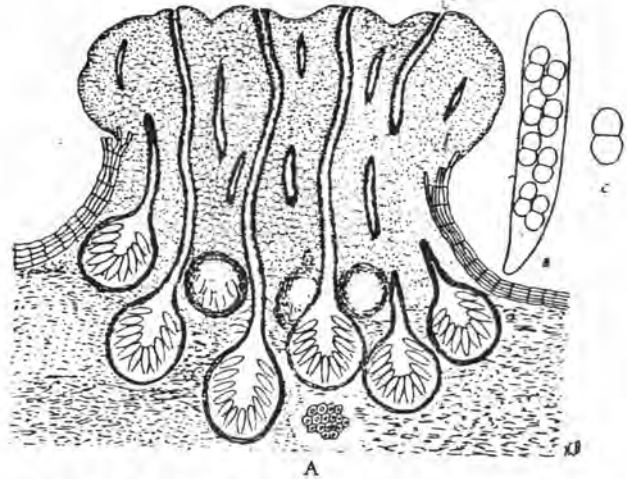
Les ascocarpes de l'Endothia parasitica sont des périthèces pyriformes à consistance coriace de 300 à 400 micromètres de diamètre (RHOANE 1978), munis d'un col très long et flexueux s'ouvrant par une ostiole à la surface du stroma dans lequel ils se forment par groupes de 12 à 20 (DARPOUX 1957). On reconnaît les stromas fertiles aux petites taches noires que font les extrémités des cols mûrs à leur surface orangée.

Chaque asque produit 8 ascospores, hyalines, ellipsoïdes, (9 x 4,5 micromètres), bicellulaires. Dans le genre Endothia, l'espèce E.parasitica se distingue surtout par la présence d'une constriction au niveau de la cloison. A maturité, si l'humidité de l'air est suffisante, les asques montent dans le col puis expulsent violemment leurs ascospores à plusieurs centimètres de distance (voir figure 7).

Par ces caractères, l'Endothia parasitica doit être rattaché à la famille des Diaporthacées.



Endothia parasitica :
A - Pycnide vue en coupe (50 gr. environ)
B - Conidiophores et conidies (gr. 1.000 environ)



Endothia parasitica :
A - Perithèces (gr. 75 environ)
B - Asques (gr. 1.500) -
C - Ascospores (gr. 2.000)

Figure 7

Organes de reproduction de l'*Endothia parasitica*. (selon DARPOUX H., 1955)
- à gauche, fructification asexuée : pycnide sous épidermique formée dans un stroma orangé expulsant les pycnospores groupées en un cirre mucilagineux.
- à droite, fructification sexuée : périthèces à l'intérieur d'un stroma de couleur orangée, bien distincts par leur paroi noire. On remarque leur long col flexueux. Les ascospores bicellulaires sont pourvues d'une constriction au niveau de la cloison médiane, caractéristique de l'espèce.

Reproduction asexuée :

=====

L'Endothia parasitica possède une forme imparfaite : Endothiella virosa (SACCARDO 1906) représentée par des pycnides, cavités irrégulièrement lobées, creusées à l'intérieur de stromas où leur formation précède, en général, celle des périthèces.

Leur paroi est tapissée de sporophores (30 x 1,5 micromètres), qui donnent naissance à des spores caduques, unicellulaires, elliptiques à sub-cylindriques (3,6 x 1,3 micromètres).

Par temps humide les pycnides libèrent leurs spores, englobées dans un mucilage visqueux, en un long cirrhe de couleur jaune qui s'enroule en forme de vrille (DARPOUX 1957), et prend, par temps sec, une consistance cornée et une couleur foncée.

Selon DARPOUX (1957), la longévité des pycnosporos en air sec dépasserait 6 mois ; cette assertion, vraie pour les spores qui sont restées agglutinées dans le cirrhe, ne l'est plus pour celles qui ont été individuellement isolées après délavage.

Caryologie des pycnosporos

=====

N'ayant pas trouvé de publication concernant les noyaux de l'Endothia parasitica, nous avons dû, au cours de travaux préliminaires, établir l'état nucléaire des spores et des sporophores.

Des frottis sur lame ont été colorés à l'hématoxyline ferrique (après fixation au HELLER, hydrolyse prolongée à chaud à l'acide chlorhydrique, puis mordantage à l'alun).

A l'examen microscopique, les noyaux prennent une légère coloration violacée ; malgré leur faible affinité pour le colorant, dans les conditions de notre travail, nous avons pu constater que les spores sont mononucléées.

Le noyau est sphérique et occupe une position centrale, les mensurations en micromètres relevées sont :

Spore : longueur: 3,6 + ou - 0,15

: largeur : 1,3 + ou - 0,18

Noyau : diamètre: 1,1 + ou - 0,08

(Intervalle de confiance calculé sur 100 mensurations au minimum)

Le matériel nucléaire occupe donc la majeure partie du volume de la spore :

Si on évalue le rapport :
$$\frac{\text{volume du noyau}}{\text{volume total de l'organe, parois comprises}}$$

On obtient :

Pour les spores : des valeurs de 0,232 à 0,259 (la spore étant assimilée à un ellipsoïde de révolution.)

Pour les sporophores : des valeurs de 0,010 à 0,016 (l'article terminal étant assimilé à un cylindre.)

Les pycnospores doivent être assimilées à des spermaties qui en plus, auraient acquis la capacité de germer en reproduisant individuellement le mycelium végétatif, assurant ainsi la reproduction asexuée de l'espèce.

Organes de dissémination

=====

Les organes de reproduction végétative sont peu fréquents sur les chancres à écorce lisse et vivante (après la mort de l'organe atteint, le parasite peut former des stromas pycnidifères sur l'écorce et le bois mort). Ils sont, par contre, beaucoup plus fréquents sur les vieilles écorces et dans les crevasses du rhytidome des vieux troncs.

Le rôle des spores dans la dissémination de la maladie a toujours été mis en avant par l'ensemble des phytopathologistes, mais sans preuve irréfutable en ce qui concerne les spores de reproduction asexuée. Pourtant, lorsqu'on veut pratiquer des inoculations sur l'hôte, en utilisant des suspensions de pycnospores ou même en introduisant directement des cirrhes dans des blessures de l'écorce, on observe très rarement la production d'un chancre. (GREUTE: travaux non publiés).

A la différence des ascospores douées d'un pouvoir infectieux élevé, les pycnospores ont si peu de réserves et sont si sensibles aux antibiotiques (elles étaient fréquemment utilisées par DARPOUX pour la

détection d'antibiotiques nouveaux), qu'il est extrêmement rare qu'elles puissent aboutir à la constitution du coussinet d'infection indispensable à la pénétration, comme nous le verrons ultérieurement.

Là où elle est présente, la reproduction sexuée joue un rôle important dans la variabilité de l'espèce. Les races du parasite, que nous définirons par leur "Groupe de compatibilité végétative" ("V.C. GROUP" de S.ANAGOSTAKIS - voir plus loin), sont beaucoup plus nombreuses dans les régions où la forme sexuée est présente. Aux U.S.A., chaque arbre peut être porteur de thalles de 4 à 10 races différentes (MACDONALD et DOUBLE 1978) et, sur une parcelle (4 ares), il peut exister plus de 13 "V.C.groups" (S.ANAGOSTAKIS 1979).

Par contre, en France, où la forme sexuée est extrêmement rare, s'il est fréquent de trouver plusieurs "souches" dans un même canton castanéicole, il est beaucoup plus rare d'en observer plus d'une dans une même commune, et exceptionnel au niveau d'une parcelle de châtaigneraie. Notons cependant que le nombre de races et leur intrication territoriale s'accroît en France d'année en année ; la cartographie effectuée par le Laboratoire d'application le montre bien.

Dans l'étude épidémiologique de l'Endothia parasitica, peu de connaissances ont été acquises sur la nature des "germes" et de leurs vecteurs. Les organes de propagation sont très probablement des propagules constitués par de petits fragments d'écorce infectée dispersés par les oiseaux et les insectes.

Les phytopathologistes se sont surtout préoccupés des pycnospores, auxquelles ils attribuaient un rôle prépondérant. Ils en ont détecté sur certains oiseaux (Dryobates pubescens, Sphrapicus varius, Certhia familiaris, Sitta carolinensis, Junco hiemalis, Regulus satrapa) et divers insectes, en particulier Amnisca macula et Synchita fuliginosa qui dévorent les pycnides.

Aucune étude suivie n'a été faite sur le transport de propagules. Nous avons seulement observé sur les chancres une pullulation de fourmis, probablement attirées par les exsudats de l'hôte plus abondants au-dessus du chancre (effet d'annellation), et aussi par le mucus des cirrhes. Nous avons pu en trouver qui transportaient de petits fragments d'écorce infectée, mais il est impossible de décider du rôle exact joué par ces insectes. Nous avons également constaté l'attrait particulier porté aux chancres par les Pics, confirmant ainsi les anciennes observations de STEWART en 1912.

Variabilité et notion de "SOUCHE"

=====

Au cours du travail, nous avons réalisé des isolements du parasite sous ses différentes formes, dans de nombreuses régions castanéicoles. Nous avons donc constitué une collection d'isolats. L'étude plus approfondie poursuivie sur l'ensemble des transferts successifs (durant 10 années) révèle des différences stables concernant :

1°) la morphologie : - pigmentation du mycélium (hyalin à jaune clair)
- abondance relative du mycelium aérien
- abondance et taille relatives des pycnides

2°) la répartition en "groupes de compatibilité végétative" ou "races" (évoqués plus haut), tels qu'ils ont été définis par S. ANAGNOSTAKIS sur la base du comportement des thalles lors de confrontations par paires en culture dans des conditions standard (48 groupes en 1978, plus de 70 actuellement)

3°) la vitesse de développement des lésions sur l'hôte (qui peut éventuellement constituer une mesure de la virulence).

Il n'y a aucune corrélation entre ces 3 types de caractères.

D'autre part, nous avons effectué, à partir d'un certain nombre des isolats de la collection, des semis monospores poursuivis sur 2 générations au moins.

La gamme de variation à notre disposition est telle que nous avons choisi de distinguer les isolats et cultures d'après leur origine et en tenant compte de tout caractère différentiel (morphologie, "V.C. group", pouvoir pathogène).

Par suite des habitudes de langage adoptées au cours de l'exercice de la lutte biologique, nous appellerons "SOUCHE" tout ensemble de cultures dérivées d'un isolat ou d'un semis monospore, dès lors qu'il présente des caractères différentiels nets.

Caractères culturaux du type "Normal"

=====

Dans nos conditions standard : culture sur milieu au malt à 1% gélosé en boîtes de Petri incubées à 26°C, les isolements du parasite présentent les caractères suivants :

Croissance végétative

L'implant montre, dès le 2^e jour, la prolifération de filaments incolores à croissance intramatricielle; les jours suivants, un mycélium aérien de couleur blanche se développe. Le thalle croît rapidement (0,3 à 0,7 cm/jour); les filaments restent hyalins à l'intérieur du milieu de culture et prennent l'aspect d'un duvet blanc dans leur partie aérienne. On note la formation de très nombreux cristaux d'oxalate de calcium. (voir figure 8).

Anastomoses

Des anastomoses nombreuses apparaissent dès le contact entre les filaments; pour la plupart elles se forment entre rameaux télémorphiques ou entre rameau télémorphique et ramification courte dont la croissance est arrêtée.

Formation des pycnides - Photosensibilité

En lumière continue, (tubes fluorescents "blanc de Luxe" placés à 50 cm des boîtes de Petri, soit une illumination à 2 000 lux), des points de couleur orangée, épars et uniformément répartis, apparaissent sur les portions de thalle âgées de plus de 4 jours. Ce sont de jeunes microstromas formés d'hyphes à articles renflés dont le protoplasme est pigmenté. Les jours suivants, ils évolueront en pycnides semblables à celles observées sur les parties âgées des chancres ; elles produisent des pycnospores typiques.

En lumière discontinue, les pycnides apparaissent en cercles concentriques, localisées exactement au point atteint par la marge du thalle au moment où la lumière a été appliquée, ce qui permet une zonation utile pour la chronologie du développement.

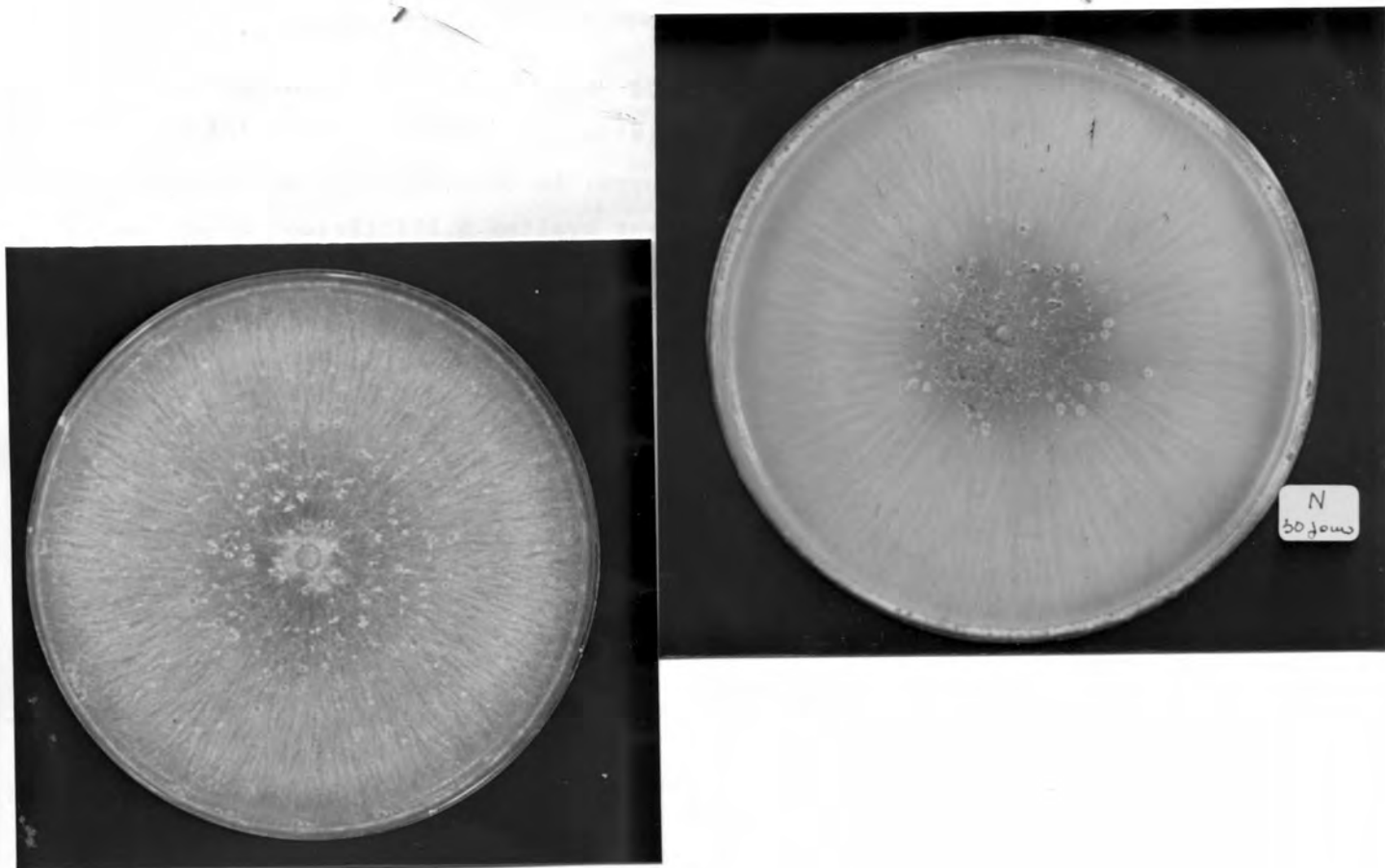


Figure 8

Aspect de la culture d'une souche "Normale" d'Endothia parasitica.
On remarque le mycellium hyalin et les stromas pycnidifères de couleur orangée
Culture de 20 jours sur milieu au malt à 1% gélosé.

Bien qu'il suffise de quelques instants d'illumination pour déclencher la production de stromas pycnidifères, nous avons retenu un éclairage de 8 heures/jour, ce qui assure le meilleur contraste entre les zones (nécessaire aux travaux sur la transmission de l'hypovirulence).

A l'obscurité permanente, les fructifications asexuées n'apparaissent qu'au 10ème jour, éparses sur le thalle; les traumatismes (simple coupure de scalpel) suscitent, à leur niveau, la différenciation des pycnides, dans le cas de la détermination des groupes de compatibilité végétative, leur accumulation sur la ligne de confrontation des thalles est attribuée à un phénomène analogue.

Au niveau de l'implant, les pycnides sont toujours plus abondantes; outre l'effet traumatique, on pourrait incriminer des molécules préformées suite à l'induction photosensible du thalle mère.

La vitesse d'apparition des fructifications varie selon les souches. Toutes celles isolées de chancres évolutifs typiques donnent des résultats positifs à l'issue de la culture pendant 14 jours à l'obscurité (plusieurs milliers de souches ont été éprouvées par ce standard au laboratoire d'application)

Dans tous les cas, les hyphes intramatricielles entre les pycnides restent incolores, même après la fructification du thalle.

Secteurs

Des secteurs à morphologie légèrement différente apparaissent souvent de façon spontanée et aléatoire; par des transferts de petits fragments ou d'apex d'hyphes, on peut montrer qu'il y a réversion vers le type d'origine après quelques repiquages.

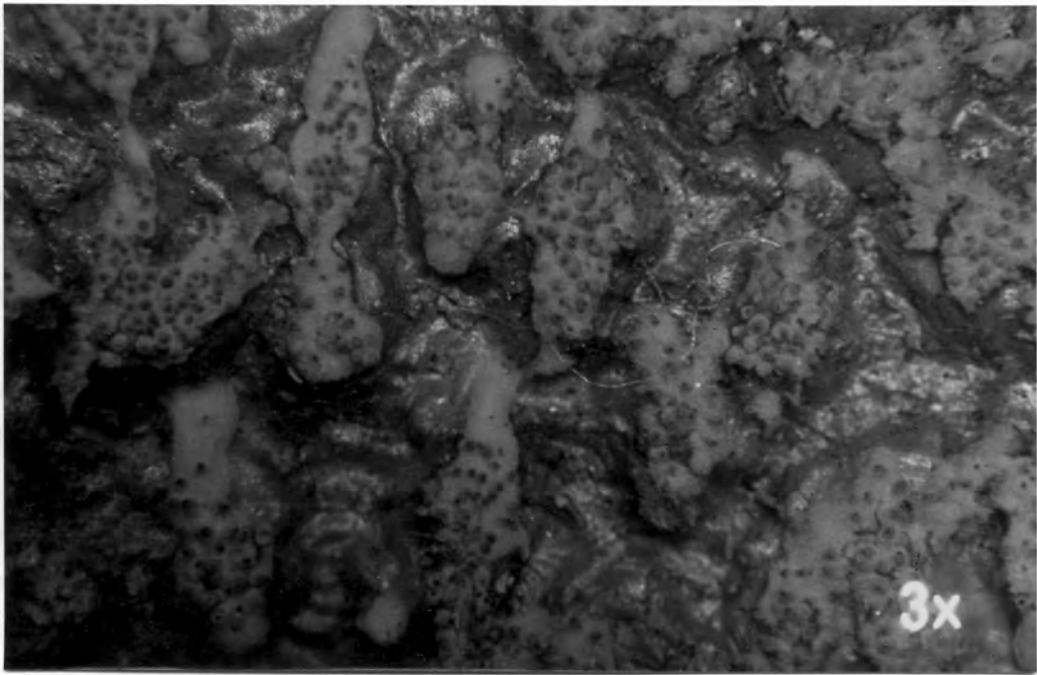
Influence des conditions de milieu

=====

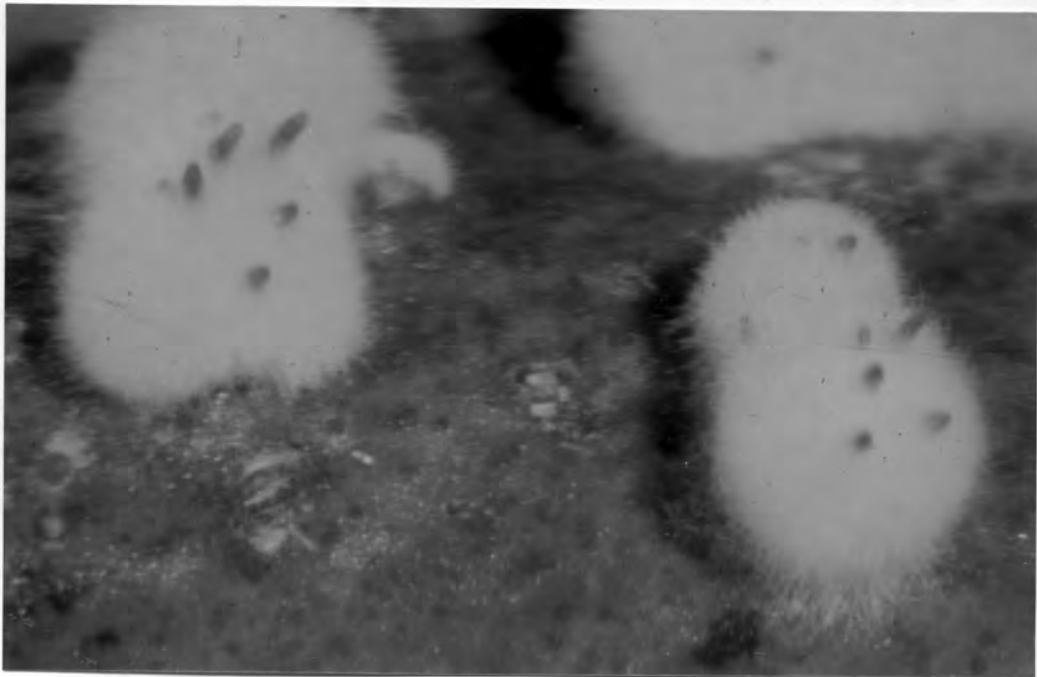
Facteurs physiques.

-Le pH optimum pour la croissance mycélienne in-vitro est 4 ; le champignon se développe très faiblement à pH 3 et pH 5,5.

-La température optimale est de 27°C (la croissance a lieu de 3 à 36°C.).



A



B

Figure 9

- Photographies de pycnides et périthèces d'*Endothia parasitica* :
- en A : sur écorce d'un chancre en provenance des U.S.A. (1964)
On remarque les punctuations noires : articles des périthèces à la surface du stroma.
 - en B : production de périthèces *in vitro* par la technique d'appariement de S. ANAGNOSTAKIS (photographie S. BERTHELAY-SAURET - Clermont-Ferrand 1980 -)

-Degré d'anaérobiose. Nous avons fait longuement bouillir du milieu liquide minimum de PUHALLA et ANAGNOSTAKIS (voir plus loin), puis l'avons soumis à un balayage par barbotage d'un courant d'azote pur pendant 48 heures, pour le débarrasser des dernières traces d'oxygène. On l'a autoclavé sous atmosphère d'azote dans des bouteilles de 500 ml, remplies à moitié et bouchées par une capsule à vis étanche. Les flacons ont été ensuite ensemencés par un très petit fragment de culture sur gélose au malt, l'opération étant exécutée sous un courant d'azote. Au début et à la fin de l'expérience, on a tenté de déceler la présence d'oxygène dissous au moyen d'un analyseur Beckmann à électrode spécifique; la teneur était inférieure à la sensibilité de l'appareil.

La croissance de l'Endothia a été normale, sans aucune différence pondérale avec les cultures oxygénées. En conséquence, dans le choix des dispositifs de culture in vitro, on n'aura pas à se préoccuper du problème de l'aération du milieu.

Facteurs chimiques

-Substances de croissance : Selon BAZZIGHER (1958), puis PUHALLA et ANAGNOSTAKIS (1970), seule la thiamine est indispensable, tant à la croissance qu'à la formation des pycnides, les auteurs ne précisent pas quelle fraction de la molécule est active : pyrimidine ou thiazole, ou si les deux sont nécessaires. Cette vitamine est également nécessaire à la différenciation des pycnides. (figure 9)

La biotine serait nécessaire à la germination des spores, mais elle pourrait être remplacée dans ce rôle par un quelconque acide aminé (elle est, bien entendu, nécessaire à l'assimilation des formes d'azote inorganique).

Activités métaboliques

=====

Enzymes pectinolytiques : MC CAROLL (1978) a décrit une polygalacturonase décelable dans les cultures pures du parasite et aussi chez l'hôte infecté (voir plus loin).

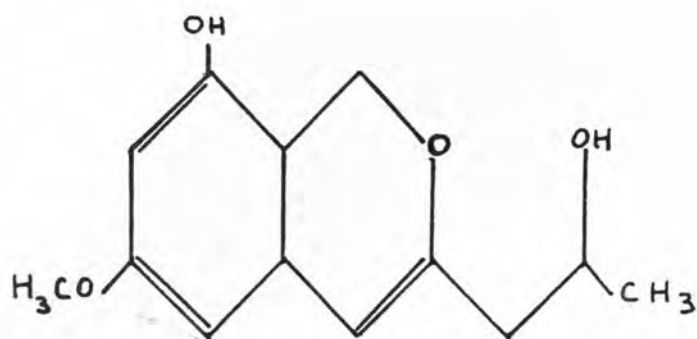


Figure 10 A :
formule chimique de la diaporphine (BAZZIGHER G., 1953)

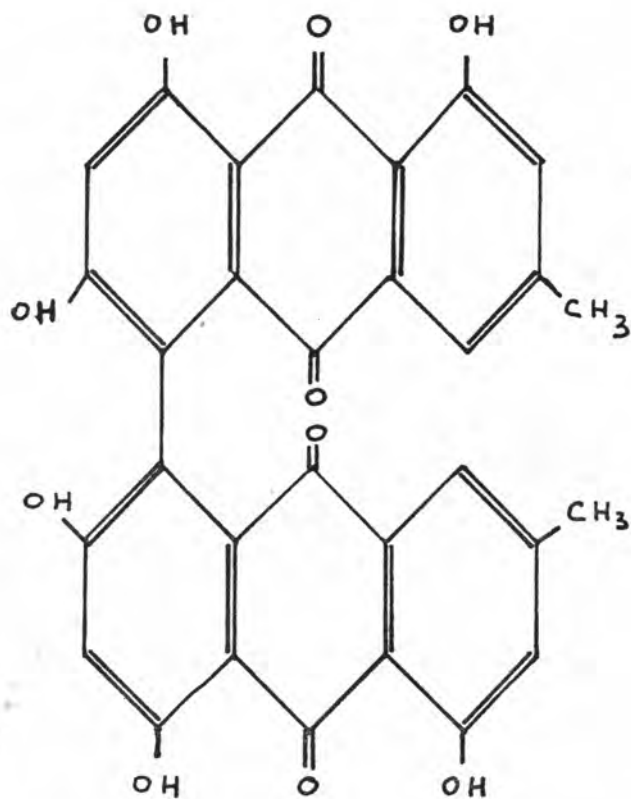


Figure 10 B
formule chimique de la skyrine (GAUMANN E. und NAEF-ROTH St., 1957)

Enzymes proteolytiques : La mieux connue est la Rennine étudiée en 1967 par SHOEVERS et BAVISOTO puis SARDINAS(1968), RAMET ALAIS et WEBER (1969), elle sert au remplacement de la présure pour la fabrication des fromages.

Production d'acide oxalique : on observe dans les cultures sur milieu au malt gélosé à 1% et à 2%, une très abondante production de cristaux d'oxalate de calcium, dès le 6ème jour; selon MC CAROLL, toutes les souches d'Endothia (y compris les hypovirulentes) élaborent de l'acide oxalique en culture sur milieu de PUHALLA et ANAGNOSTAKIS (à condition de substituer au glucose du polypectate de Ca comme seule source de carbone).

Diaporthine : L'acide oxalique n'est pas le seul métabolite toxique élaboré par l' Endothia : BAZZIGHER (1953) a extrait des filtrats de culture un complexe dans lequel a été isolée une anthraquinone toxique : la diaporthine. (cf. formule développée figure 10).

Autres produits toxiques : Les deux pigments des stromas fructifères : skyrine et rugulosine auraient, selon BAZZIGHER (1957), une action phytotoxique (tests sur plants de tomates et sur feuilles de châtaignier) -figure 8-. Les propriétés phytotoxiques des milieux de culture où l'Endothia s'est développé sont souvent utilisées dans les travaux sur la production de phyto- et de vivo-toxines, récemment LAPLACE a étudié à notre laboratoire des fractions de ces extraits et mis au point un procédé de dosage qui pourrait être mis en relation avec la virulence des souches.

Production d'éthanol : Dans la fabrication de l'inoculum de souches hypovirulentes utilisé pour la lutte biologique, nous avons constaté une production abondante d'éthanol ainsi qu'un dégagement de gaz carbonique. D'ailleurs, si on produit les "pellets" dans des flacons hermétiques, la pression augmente (les conséquences en sont expliquées plus loin).

L'Endothia effectue donc, même en présence d'oxygène, la fermentation alcoolique (voir aussi à la technique des inoculums en pâtes).

<u>Milieu Minimum (Mm):</u>	Solution minérale	62,5 ml.
	Thiamine	2 mg.
	Glucose	10 g.
	Eau	Q.S. pour 1 litre

<u>Milieu complet (Mc) :</u>	Comme pour Mm :	puis ajouter :
	Extrait de levure DIFCO	2,5 g.
	Extrait de malt DIFCO	7,5 g.

pour obtenir, dans les 2 cas, un pH inférieur à 4, on utilise le tampon PO_4KH_2 - acide citrique (0,5 M). On autoclave la gélose séparément.

Milieux à l'amidon de maïs

On peut trouver dans le commerce, sous le nom de "MAIZENA", un amidon de maïs destiné à des usages culinaires. On l'utilise de la façon suivante :

Milieu simple (non nutritif) :

On fait bouillir 65 g de Maïzena dans 1 litre d'eau, sur un agitateur magnétique chauffant, jusqu'à obtention d'un gel; on répartit puis on stérilise à 120°C pendant 30 minutes. On obtient une gelée semi-fluide qui, après trituration, prend la consistance d'une pâte. Ce milieu non nutritif permet de suspendre le développement des microthalles utilisés dans la lutte biologique, et de les conserver pendant plusieurs mois à la température ordinaire (voir plus loin).

Milieu complet (nutritif) :

- 1/ on prépare 500 ml de gelée de Maïzena comme pour le milieu simple mais à concentration double (130 grammes/litre).
- 2/ on porte une quantité égale de milieu au Malt à 2% à ébullition pendant 20 minutes, puis on filtre sur papier.
- 3/ on mélange les deux préparations encore chaudes, on répartit, on stérilise 30 minutes à 120°C.

Ce milieu permet la croissance du champignon.

Confrontation des thalles

=====

Détermination du Groupe de Compatibilité Végétative

a/ technique originale de S.ANAGNOSTAKIS (1977) - figure 11 -

- Inoculum : cultures en boîtes de Petri sur PDA mb₍₁₎, âgées de 7 jours (petits cubes de 2 mm de côté environ).

- Test : en boîtes de Petri de diamètre: 100 mm, contenant 25 ml de PDA mb; les cubes d'inoculum sont placés à environ 1 cm les uns des autres - 28 implants par boîte.(voir illustration);

- Incubation : à 25°C, à l'obscurité, pendant 5 à 10 jours.

b/ technique I.N.R.A. (S.BERTHELAY-SAURET non publié) - figure 12 -

- Inoculum : cultures en boîtes de Petri sur malt à 1%, âgées de 6 à 7 jours (petits cubes de 2 mm de côté environ pris en marge du thalle).

- Test : en boîtes de Petri de diamètre: 90 mm, contenant 20 ml de malt à 1% (les cubes d'inoculum sont placés par paires côte à côte, 2 paires par boîte, voir illustration).

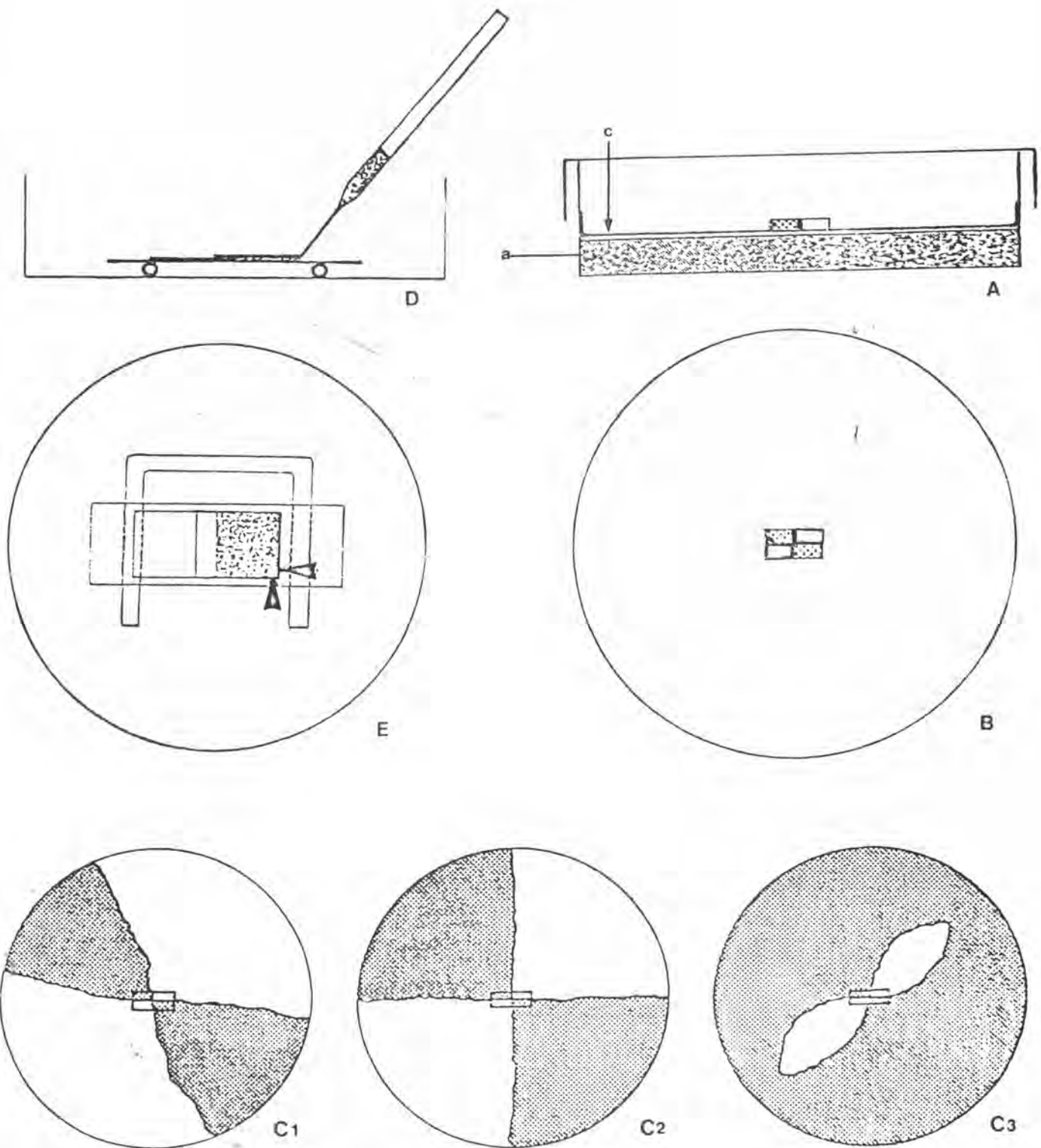
- Incubation : à 24-26°C, à l'obscurité, pendant 10 à 15 jours.


Transmission de l'hypovirulence

a/ culture sur disque de cellophane

Pour l'étude de la transmission de l'hypovirulence, on augmente les chances d'anastomoses en forçant le contact des filaments en croissance. On place un disque de cellophane dûment stérilisé à la surface d'une plaque de milieu au malt à 1% gélosé coulé en boîte de Petri. Il ne doit pas subsister de bulles d'air entre la feuille de cellophane et la plaque d'Agar (figure 13 A).

(1) Milieu PDA mb = PDA + méthionine: 100 mg/litre + biotine (1mg./l).



 Thalle N


 Thalle B

FIGURE 13

- A - culture sous cellophane c, sur plaque d'agar a.
- B - dispositif à 4 implants, donnant les développements C₁ à C₃
- C₁ à C₃ - dispositions observées selon les vitesses de croissance N et B.
- D - technique pour l'observation des anastomoses : préparation de la lame
- E - idem : ensemencement, selon les deux flèches.

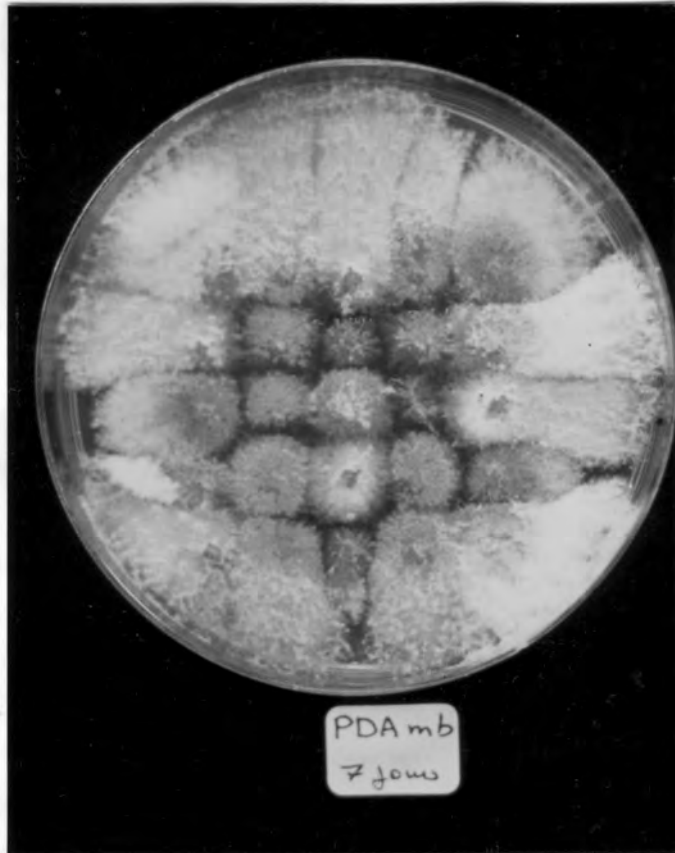


Figure 11

Photographie du dispositif de confrontation des souches N pour la détermination du "V.C.Group" selon S. ANAGOSTAKIS. (photographie S. BERTHELAY-SAURET)

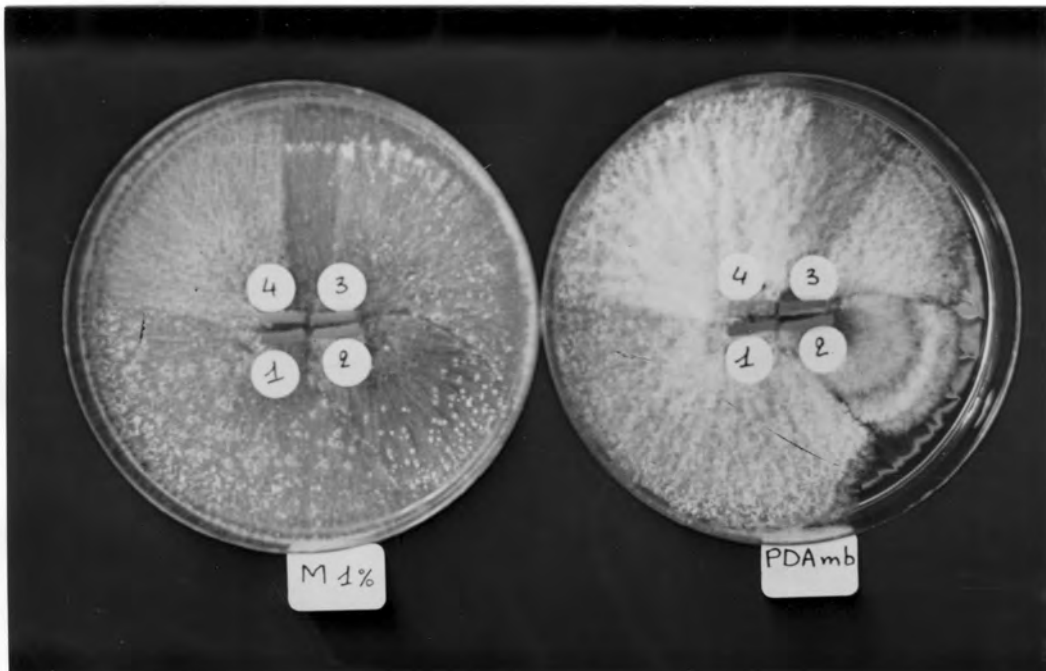


Figure 12

Dispositif de confrontation de souche N modifiée par S. BERTHELAY-SAURET (1978) (photographie S. BERTHELAY-SAURET)

La stérilisation doit obligatoirement être exécutée selon le protocole suivant : les disques de cellophane sont introduits par 20 dans des boîtes de Petri remplies d'eau au 3/4, en prenant bien soin d'éliminer les petites bulles d'air qui pourraient se former entre les disques. Après 30 minutes de stérilisation à 120°C, les feuilles sont rincées à l'eau courante, pendant environ 2 heures, puis stérilisées à nouveau, toujours par 20, dans d'autres boîtes de Petri, suivant le même processus (1).

On ensemence en déposant sur la cellophane deux petits implants parallélipipédiques, juxtaposés (voir figure 13 B). Chacun est découpé au scalpel dans la marge d'un thalle cultivé sur milieu au malt à 1%, âgé de 6 à 10 jours

Les filaments croissent à la surface du film cellulosique et se nourrissent par osmose. Au niveau du front de contact des deux thalles, les chances d'anastomoses sont élevées (sauf dans le cas, rare, où une répulsion s'exerce entre les filaments); s'il n'y a pas d'interaction entre les deux thalles, le front est rectiligne et incliné par rapport à la perpendiculaire à l'axe des implants, en fonction des vitesses relatives des deux souches (voir figure 13 C).

Dans la pratique des épreuves de "sélection de souches hypovirulentes compatibles", on utilise un dispositif à quatre implants qui permet d'obtenir quatre fronts de contact dans chaque boîte de Petri (figure 13 B).

Pour l'étude microscopique des anastomoses, on utilise un film de milieu nutritif gélosé (malt à 10%), coulé entre lame et lamelle (le dispositif comporte une cale pour ménager la place nécessaire à une épaisseur de 0,5 mm); on ensemence les deux souches sur deux côtés contigus de la lamelle et à 2 mm de l'angle (les lames ainsi préparées sont conservées en boîtes de Petri en atmosphère humide). - figures 13 D et 13 E -.

(1) Il est particulièrement difficile de trouver dans le commerce des cellophanes qui ne soient, ni traitées par des fongicides, ni plastifiées et qui soient capables de supporter les opérations de stérilisation.

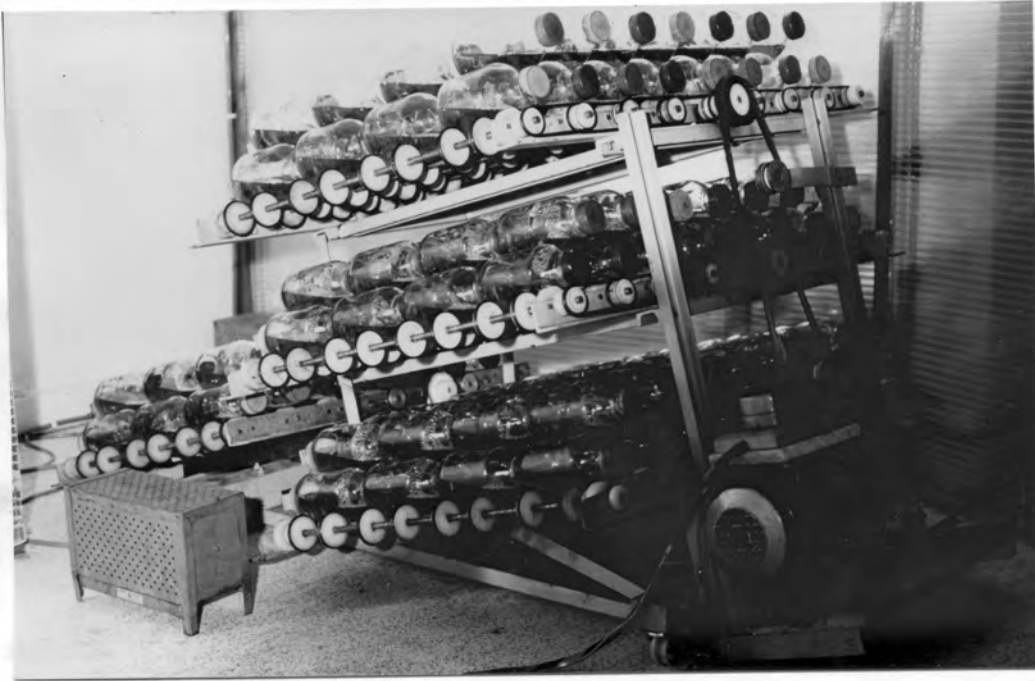


Figure 14 : Agitateur pour la production des "pellets" en flacons.

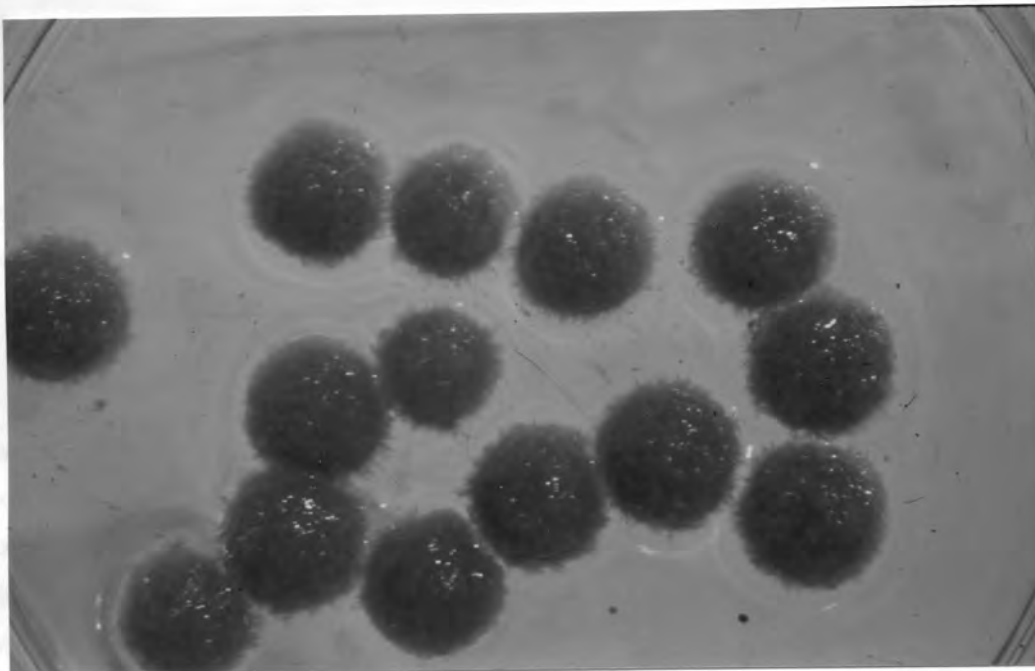


Figure 15 : Pellets produites en flacons.

Les filaments des deux thalles se développent d'abord en directions perpendiculaires, puis ils s'infléchissent l'un vers l'autre.

Tant que les deux thalles n'ont pas atteint un degré de ramification trop important, il est facile de savoir de quel thalle provient un filament repéré à l'observation microscopique.

Dans les conditions de l'étude, 24 à 48 heures suffisent pour obtenir le contact des thalles. Les anastomoses se forment immédiatement, leur évolution complète demande encore 48 heures, les observations les plus significatives sont effectuées à la 96^e heure après l'ensemencement.

Production des inoculums

=====

Les inoculums sont produits sous deux formes : les "pellets" et les pâtes (broyats incorporés à un milieu de conservation).

Production d'inoculum en "pellets"

La "Schüttel Kultur" de BAZZIGHER (1962) consiste à ensemercer des flacons de milieu liquide par une suspension de conidies ou de petits implants cubiques de 1 mm de côté. Les spores germent, produisant des filaments qui se ramifient. On soumet le liquide à des microtourbillons; les filaments en croissance sont appliqués les uns contre les autres; les ramifications s'intriquent et on obtient des "pellets", thalles sphériques pouvant dépasser 1 cm de diamètre. On stoppe la culture lorsque les pellets ont un diamètre de 5 mm (figure 14).

Deux procédés peuvent être employés pour l'obtention de pellets.

a- Culture en flacons - Des "poudriers" de 500 ml fermés par une capsule à vis étanche, sont remplis aux 2/5 de leur volume avec du milieu au malt à 1%. Après ensemencement, on les place sur des galets qui les maintiennent dans une position inclinée (leur grand axe fait un angle de 15° avec l'horizontale), et les animent d'un mouvement de rotation autour de leur axe avec une vitesse de 15 tours par minute.

Le développement demande 3 jours environ; certaines souches nécessitent 4 ou même 5 jours de culture (figure 15).

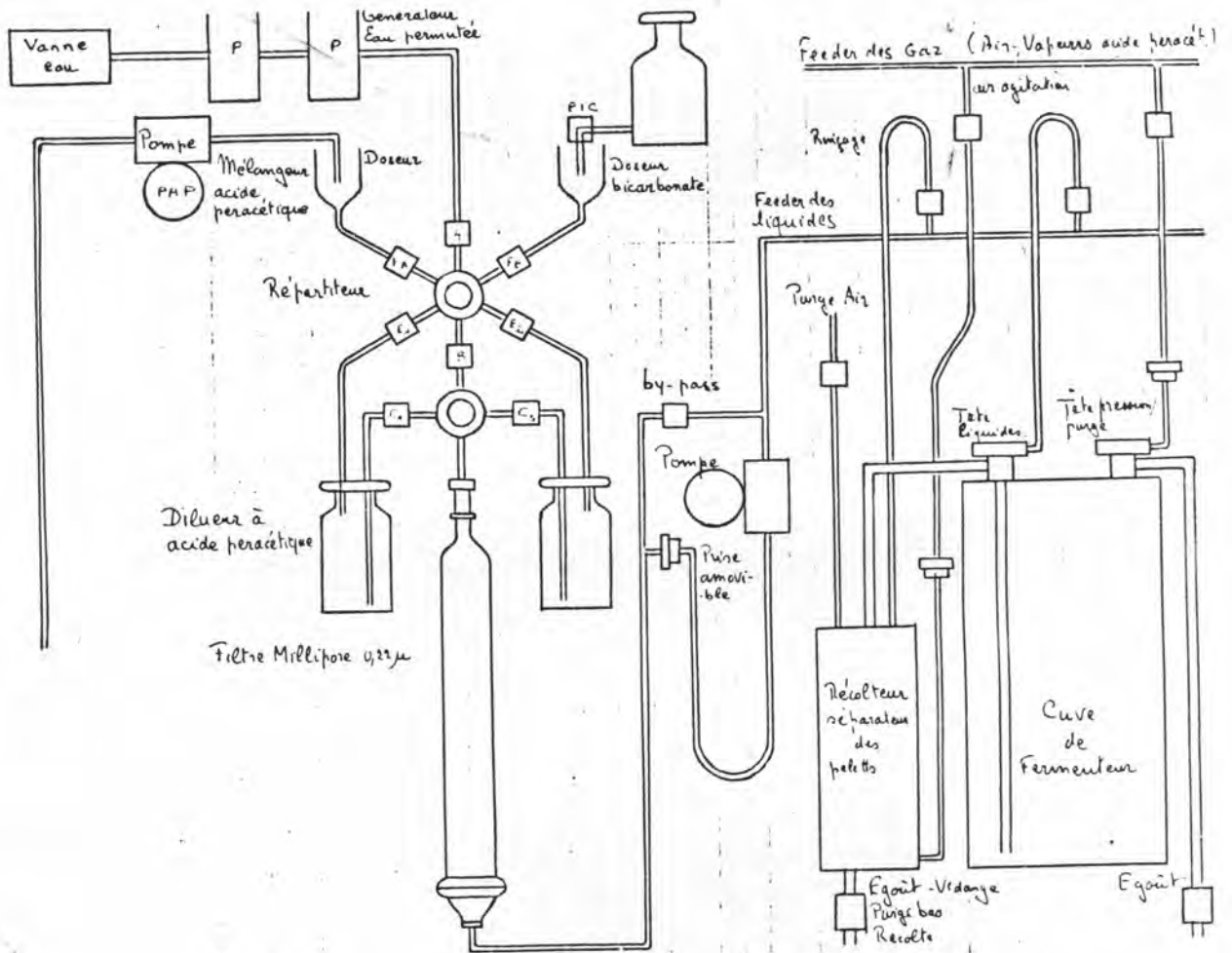


Figure 16

Schéma simplifié d'un fermenteur (document destiné à la planification de la circulation des fluides) Les appareils de régulation et d'automatisation ne sont pas représentés, ni le dispositif d'agitation.

NOTE : la technologie retenue répond aux nécessités d'une construction économique. Les cuves de fermentation sont en acier mince (2 mm), ce qui interdit la stérilisation par la vapeur sous pression. On stérilise par l'acide peracétique, ce qui impose des manipulations automatisées.

b- Culture en fermenteurs - Adaptée à la production en grandes quantités, elle dérive de la précédente. Les tourbillons sont créés par l'effet du décentrement d'une pale qui tourne lentement (1/2 tour par seconde); ses particularités tiennent à des détails de géométrie des appareils (figures 16 et 17).

Ces deux techniques mettent à profit les propriétés d'anaérobiose partielle du mycélium. Le fait essentiel est que la culture doit être effectuée à l'intérieur d'un milieu animé de mouvements cycliques, mais sans turbulence brutale comme c'est le cas dans nombre de techniques d'agitation. La raison en est la fragilité des filaments en croissance : les pellets ne peuvent se constituer et grossir que si tous les thalles ont un développement synchrone; toute fragmentation conduirait à l'apparition de petites "pellets" à développement déphasé ; de plus la densité de thalles dans le milieu est un facteur critique (qui varie d'ailleurs avec la souche utilisée).

Le dispositif ne doit donc pas comporter d'arête vive et, en aucun point, la vitesse des filets de liquide ne doit être suffisante pour provoquer la rupture des hyphes.

Quand les pellets ont atteint leur taille définitive, on les sépare du milieu par divers dispositifs à tamis, puis on les lave à deux reprises à l'eau stérile. Certaines souches produisent de grandes quantités de gaz carbonique et des microbulles peuvent être piégées à l'intérieur des pellets, les rendant plus légères que le liquide ; il est nécessaire de les soumettre à un vide partiel pour les "dégazer" et leur permettre de baigner dans le liquide.

On conditionne les pellets en flacons de 100 à 150 ml, dans une quantité d'eau stérile juste nécessaire pour recouvrir leur masse

La conservation des pellets doit être faite à température basse: 4°C, elle peut dépasser 6 mois mais, dans la pratique, on ne dépasse pas 60 jours.



Figure 17

Vue partielle de la batterie de 6 fermenteurs, des appareils annexes et d'automatisation, au Laboratoire du C.N.I.C.M. à Clermont-Ferrand (réalisation J. GRETE 1975-76)

Production d'inoculum "en pâtes"

a- Cultures destinées à la production de broyats - Afin d'éliminer le mycélium aérien qui gêne le broyage, on utilise des boîtes de Petri de milieu au malt à 1% gélosé, que l'onensemence au moyen de très petits implants, on recouvre ensuite avec un disque de cellophane (voir ci-dessus la technique de préparation). Le mycélium se développe entièrement dans l'épaisseur du milieu.

b- Broyage - Après enlèvement de la feuille de cellophane, le contenu de la boîte de Petri est coupé en 4 secteurs. Chaque secteur est introduit dans un tube à essai stérile (diamètre : 22 mm, longueur : 20 cm), avec 15 ml d'eau stérile, puis broyé au "Polytron" équipé d'un générateur de 1 centimètre de diamètre (type 10 S), à 20 000 tours/ minute pendant 10 secondes.

c- Trituration - Le broyat est ensuite mélangé à 400 ml de milieu simple à la Maizena dans un poudrier de 500 ml, puis agité manuellement jusqu'à obtention d'une pâte grumeleuse. La pâte est répartie dans des tubes d'aluminium vernissés intérieurement (tubes destinés au conditionnement des produits pharmaceutiques), par une machine automatique; elle est homogénéisée par passage dans une pompe à galets.

d- Conservation - Les tubes de pâte peuvent être conservés à la température ordinaire durant 4 à 6 mois, contrairement aux pellets qui requièrent d'être maintenues à 5°C et dont l'utilisation est aléatoire passé deux mois. La pâte ne se liquéfie pas, sauf pour certaines souches qui produisent une grande quantité d'éthanol (par exemple : les S 2103 et 2104 liquéfient la pâte après 2 mois ; la S 2106 ne peut être conservée que 3 semaines).

Isolement du champignon

=====

Cas des écorces vivantes

L'isolement est particulièrement facile si l'on s'adresse à des échantillons d'écorce de 2 cm de côté et de 5 mm d'épaisseur au moins.

Après désinfection générale, par trempage à l'alcool et flambage superficiel, on découpe de petits implants (0,5 à 1 cm de côté) à la limite entre les tissus sains et la zone infectée; on les transplante en boîtes de Petri, sur milieu au malt gélosé à 1%.

Le taux de réussite est élevé; on procède ensuite, si besoin est, à la purification des isolats. Le mycélium d'Endothia parasitica est suffisamment caractéristique pour permettre sa sélection (au laboratoire d'Application, on effectue entre 2 000 et 3 000 isollements par an).

Cas des écorces desséchées

Il faut choisir des échantillons le plus épais possible et pratiquer une désinfection préalable au chlorure mercurique (1% - une minute), suivie de plusieurs rinçages à l'eau stérile, ou à l'eau oxygénée (10 volumes, diluée au 1/3).

Cas des écailles du rhytidome

L'isolement y est particulièrement délicat : conséquence de l'invasion des tissus morts par les saprophytes. Il est aussi possible que le parasite ne soit plus en vie dans certaines portions des écailles.

Semis monospores

=====

On part d'une suspension de spores obtenue par écrasement d'une pycnide sur une lame stérile et mise en suspension dans quelques gouttes d'eau stérile. On dilue ensuite à 2 ml. on ajuste à 4 000 spores au ml. de façon à obtenir des micro-gouttes (0,001 ml.) contenant 4 à 5 spores.

Au moyen d'une pipette à double étirement, on dépose des microgouttes à la surface d'un film de milieu nutritif (malt à 1%) en boîte de Petri. On incube 24 h. à 23°C.

On observe au microscope stéréoscopique au grossissement 64 diamètres, la présence des tubes germinatifs permet la sélection, l'isolement et le transfert des spores germées sur milieu nutritif en tubes à essais.

Cette technique doit être pratiquée en conditions stériles et l'utilisation d'une hotte à flux laminaire est d'un grand secours.

Inoculation des arbres

=====

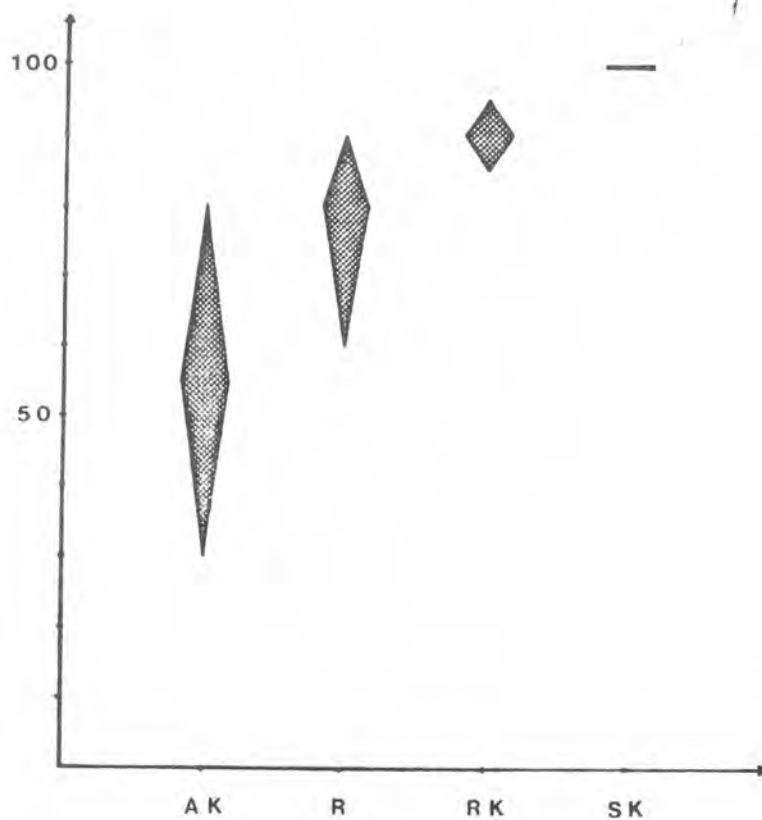
Tout travail expérimental en pathologie végétale implique la maîtrise d'une technique sûre pour reproduire la maladie par inoculation. Antérieurement, nous avons été confronté avec ce problème pour l'épreuve de la résistance génétique au chancre de diverses espèces et hybrides de châtaignier.

D'autres chercheurs se trouvaient dans la même situation, en particulier BAZZIGHER, à la Station de Recherches Forestières de ZURICH (BIRMENSORFF). Le travail a été mené parallèlement dans les deux laboratoires de ZURICH et de CLERMONT-FD.

Pour pratiquer des tests de résistance fiables, le but à atteindre est de disposer d'une méthode permettant de réussir l'infection à coup sûr dès les premières épreuves, lorsque l'inoculation est pratiquée sur un clone ou un écotype sensible. La nature de l'inoculum est le facteur le plus important (figure 18).

Nous verrons plus loin que l'inoculum doit être en mesure d'élaborer divers métabolites toxiques et enzymes indispensables à sa pénétration avant le 4e jour, ce qui est lié à la taille et à l'état physiologique de l'inoculum.

Figure 18 : Comparaison de plusieurs méthodes d'inoculation



Réussite de l'infection sur des individus sensibles :

AK par mycelium extrait de culture sur Agar

R par fragments d'écorce infectée

RK par fragments d'écorce infectée sélectionnés et ajustés

SK par pellets de "Schüttel Kultur".

(extrait de BAZZIGHER.G., 1962)

On doit à BAZZIGHER (1962) la "Schüttel Kultur", méthode déjà décrite qui permet la production de pellets particulièrement riches en apex sécréteurs de métabolites. Nous avons pu montrer que ce type d'inoculum constitue, à la surface des plaies, un coussinet d'infection de 1cm de diamètre (le double de celui de la boulette), en 6 heures, à 24°C. Ce pouvoir de prolifération très puissant est un des facteurs de réussite de l' inoculation (ou de l'efficacité de l'inoculum).

La technique consiste à introduire l'inoculum dans un trou pratiqué dans l'écorce, au moyen d'un emporte-pièce (diamètre 5mm), immédiatement avant l'inoculation. On protège l'inoculum en place par une bande de ruban adhésif.

Les inoculums en pâte à la Maïzena conduisent au même résultat.

Observation des chancres

=====

Observations au champ - Dans les châtaigneraies et les pépinières expérimentales, un certain nombre de chancres sont régulièrement examinés et notés.

Pour chacun, on note les caractéristiques macroscopiques : nature et diamètre de l'organe attaqué; emplacement et dimensions du chancre : plus grand et plus petit axe; caractéristiques de la zone corticale : couleur en surface, dépression à la marge, importance des fentes et crevasses longitudinales, aspect du rhytidome, répercussion sur la vitalité de la partie apicale.

Dans la châtaigneraie, on procède, sur les chancres étudiés, à des sondages en différents points, par dissection sommaire au scalpel pour connaître la profondeur atteinte par le mycélium, et surtout, la présence, sous des tissus atteints, d'une écorce de néoformation (dont on mesurera l'épaisseur).

Nous avons souvent effectué des prélèvements en découpant des cylindres d'écorce, au moyen d'un emporte-pièce de 1 cm de diamètre. Dans les études précises sur l'évolution des chancres en relation avec la virulence des souches, on a prélevé une série de cylindres contigus tout le long du grand axe de la lésion qui nous est apparu comme une direction préférentielle de croissance du parasite, incluant quelques centimètres d'écorce saine de part et d'autre de la lésion.

L'examen à la loupe des feuilletts d'écorce permet de déceler la présence des éventails mycéliens ainsi que les organes de fructification du champignon.

Observations au laboratoire - Les fragments d'écorce malade prélevés sur l'arbre, ou quelquefois les chancres entiers, peuvent servir de point de départ à une étude microscopique.

Pour étudier la répartition du, ou éventuellement des, thalles de différentes souches dans un chancre, on utilise les cylindres d'écorce prélevés sur le terrain, on les clive en strates correspondant chacune à un niveau de profondeur avant de les soumettre aux examens ou aux isolements.

Les modifications pariétales sont recherchées grâce aux techniques classiques de coloration.

Nous avons particulièrement utilisé, pour :

- Anatomie générale : bleu de méthylène - rouge de ruthénium.
- Détection du mycélium dans les cellules et tissus : bleu coton lactique ou deltapurpurine en solution aqueuse. Les meilleurs résultats sont obtenus avec le bleu de toluidine (solution dans l'acide acétique à 1%, légèrement glycerinée).
- Lignification des parois cellulaires : réaction de MAULE et réaction à la phloroglucine chlorhydrique.
- Subérification : rouge Soudan III.
- Détection des tannins : réaction au chlorure ferrique.

Techniques d'analyse statistique

=====

Pour tout ce qui concerne le travail antérieur à 1979 c'est-à-dire avant l'étude épidémiologique, il était possible de se contenter des méthodes classiques de statistique élémentaire entre autres, le test du χ^2 pour le traitement des tables de contingences simples, l'analyse de variance jusqu'à l'interaction du 1er ordre appliquée aux expériences de type factoriel qui sont les plus nombreuses.

Dans tous les cas, avant d'appliquer les méthodes, nous avons construit les histogrammes de répartition des données en classes afin d'avoir une idée de la distribution des variables. En cas de besoin, nous avons appliqué les transformations classiques (logarithme, arc cosinus, racine carrée).

Sur les données transformées, nous avons systématiquement appliqué un test de normalité par le test du χ^2 sur les répartitions de fréquences en 10 classes équiprobables.

Dans le cas des analyses de variance, nous avons appliqué systématiquement le test de χ^2 de BARTLETT pour éprouver l'indépendance de la variance par rapport à la moyenne; dans le cas où le résultat est négatif, fait bien courant en biologie, nous avons soit procédé à la transformation des variables, soit limité l'analyse au test F.

Dans quelques cas, nous avons établi des coefficients de corrélation mais uniquement lorsque nous disposions de plus de 30 couples de mesure.

La grande difficulté est que la plupart des paramètres représentent des variables non continues.

A partir du moment où nous avons eu à traiter de l'épidémiologie et où nous avons eu en notre possession des données nombreuses, nous avons décidé de faire un appel plus ample aux techniques statistiques de traitement des données.

Deux stades sont à considérer : la méthodologie provisoirement utilisée à laquelle se substitueront des études précises.

Pour la méthodologie provisoire, il s'agissait :

- 1/ d'établir les corrélations entre les différents paramètres mesurés sur le terrain.
- 2/ d'établir celles qui lient les notes de cicatrisation attribuées au chancre et le comportement observé au cours du temps.
- 3/ de les concrétiser par des méthodes de calcul aboutissant à une note de cicatrisation.
- 4/ d'établir la corrélation entre les notes attribuées au chancre et leur situation par rapport aux chancres cicatriciels traités ou non.

Dans cette méthodologie, nous utilisons d'abord l'examen des histogrammes; ensuite nous calculons le χ^2 pour les tables de contingence et nous pratiquons la partition de ce test, évaluant pour chaque case du tableau sa participation au χ^2 général.

Il est évident que les problèmes posés sont justiciables des méthodes avancées d'analyse des données : analyse factorielle des correspondances, analyses en composantes principales, analyse discriminante, classification automatique.

La mise en oeuvre de ces méthodes nécessite un outil informatique et une expérience que nous ne possédons pas encore, mais que nous avons entrepris d'acquérir : là sont les raisons de l'adoption d'une méthodologie provisoire et approximative. Les conclusions qui en seront tirées ne donneront qu'une analyse partielle du problème; elles ne permettront pas d'extraire des données toute l'information qu'elles contiennent, mais elles ne peuvent conduire à des résultats erronés.

Technique de calcul

=====

Le laboratoire où l'étude est effectuée dispose d'un système informatique de petite taille mais aux performances de calcul élevées.

Il s'agit d'un système Z 89 de DATA Research, fonctionnant sous CP/M et HDOS, doté de 64 kilooctets de mémoire de travail, de 600 kilooctets de mémoire de masse. Les principaux langages de programmation sont utilisables (Fortran, Basic, Pascal).

La version 5 du Basic Microsoft s'est montrée suffisamment performante pour les analyses statistiques classiques, elle peut même supporter les analyses factorielles des correspondances et les analyses en composantes principales, sans problème autre que le temps de traitement.

CHAPITRE II

ETUDE COMPARATIVE DE DEUX FORMES D'EVOLUTION DU CHANCRE

A - LE CHANCRE A ENDOTHIA ET SON EVOLUTION NORMALE

Localisation

Installation et colonisation des tissus

Mécanismes de l'infection

Symptômes précoces

Symptômes secondaires

Comportement du châtaignier en présence de la maladie

Anatomie de la plante malade.

B - LA CICATRISATION SPONTANEE DES CHANCRES

Premières prospections des châtaigneraies italiennes et françaises

La cicatrisation dans les taillis

Chancre cicatriciels sur jeunes arbres de semis

Chancre cicatrisés en France

Prospections ultérieures

Etude comparée des chancres

C - LES SOUCHES "B"

Recherche, caractérisation et localisation du parasite dans les différents types de chancres.

Travaux initiaux (1964-1965)

Travaux postérieurs à 1965

CONCLUSIONS

ETUDE COMPARATIVE DE DEUX FORMES D'EVOLUTION DU CHANCRE

A - LE CHANCRE A ENDOTHIA ET SON EVOLUTION "NORMALE"

Nous décrirons l'évolution des lésions en suivant la chronologie de l'infection.

Localisation

=====

L'Endothia parasitica attaque uniquement la partie aérienne du châtaignier. On peut mettre en cause une action inhibitrice du sol, puisque les rejets de souche ne sont jamais attaqués dans leur partie souterraine bien que leur structure anatomique soit celle d'une tige. Les attaques se produisent sur les branches à tous les stades de développement, depuis les brindilles de la cime jusqu'à la base des troncs et des rejets de souche, mais elles se localisent toujours au niveau d'une blessure : plaie de taille, de grêle, gélivure ou fissure provoquées par l'effet des alternances conjuguées de compression et de tension dues au vent au niveau des ramifications.

Installation et colonisation des tissus

=====

Le parasite ne s'installe jamais au niveau d'une écorce intacte. En effet, pour que l'infection réussisse, il faut que deux processus consécutifs interviennent.

- Dans une première phase saprophytique de son développement, il constitue un "coussinet d'infection", il élabore alors des toxines et des enzymes qui altèrent les tissus de la plante (GRENTE 1975).
- Dans une seconde phase, il s'installe en parasite dans les tissus ainsi perturbés.

Les enzymes et toxines ne peuvent agir sur des tissus protégés par une assise corticale intacte cutinisée et subérifiée et d'autre part,

le mycélium est incapable de pénétrer par les ouvertures naturelles, stomates et lenticelles. Seules des blessures fraîches (moins de quatre jours), permettent l'établissement de la relation parasitaire: du coussinet d'infection partent des hyphes agrégées en "palmettes" ("éventails" dans la terminologie des auteurs anglophones), qui revêtent la forme de lames minces. Elles s'étendent tangentiellement entre les assises cellulaires du parenchyme cortical (voir figure 19 A).

Cette invasion primaire est suivie par la colonisation progressive des assises sous-jacentes, effectuée par des hyphes individuelles se développant en direction radiale, qui engendreront plus profondément de nouvelles strates de palmettes tangentielles.

Mécanismes de l'infection

BRAMBLE (1936) considère que la progression des agrégats de mycélium, au cours de la pénétration comme de la colonisation des tissus, est le résultat de la croissance du champignon et que les éventails agissent comme des coins qui, par une action purement mécanique, écarteraient les cellules pour s'insinuer entre elles.

Cet auteur ne semble donc pas prendre en considération le rôle des filaments indifférenciés et à croissance tangentielle que nous avons observés 4 à 5 jours après l'inoculation, en position inter- et intracellulaire, à 1mm du bord de la lésion. De plus, il ne donne aucune précision sur les mécanismes du développement des filaments individuels à croissance radiale.

Nous avons aussi observé après la différenciation des palmettes, le collapsus des cellules situées au voisinage du front des masses mycéliennes; dans cette zone, les tissus deviennent d'abord translucides puis, 24 à 48 heures plus tard, se nécrosent et noircissent. RANKIN signalait déjà en 1914 cette "zone gélatineuse" et lui attribuait un rôle dans la nutrition du mycélium.

Selon les travaux de BAZZIGHER (1955), puis MC.CAROLL (1978), la progression du mycélium ferait appel à l'action d'enzymes et de toxines.

Le pH des tissus (5,5) est favorable à l'activité de la polygalacturonase produite en culture pure par l'Endothia ; mais elle ne serait active sur les composants pectiques de la lamelle moyenne

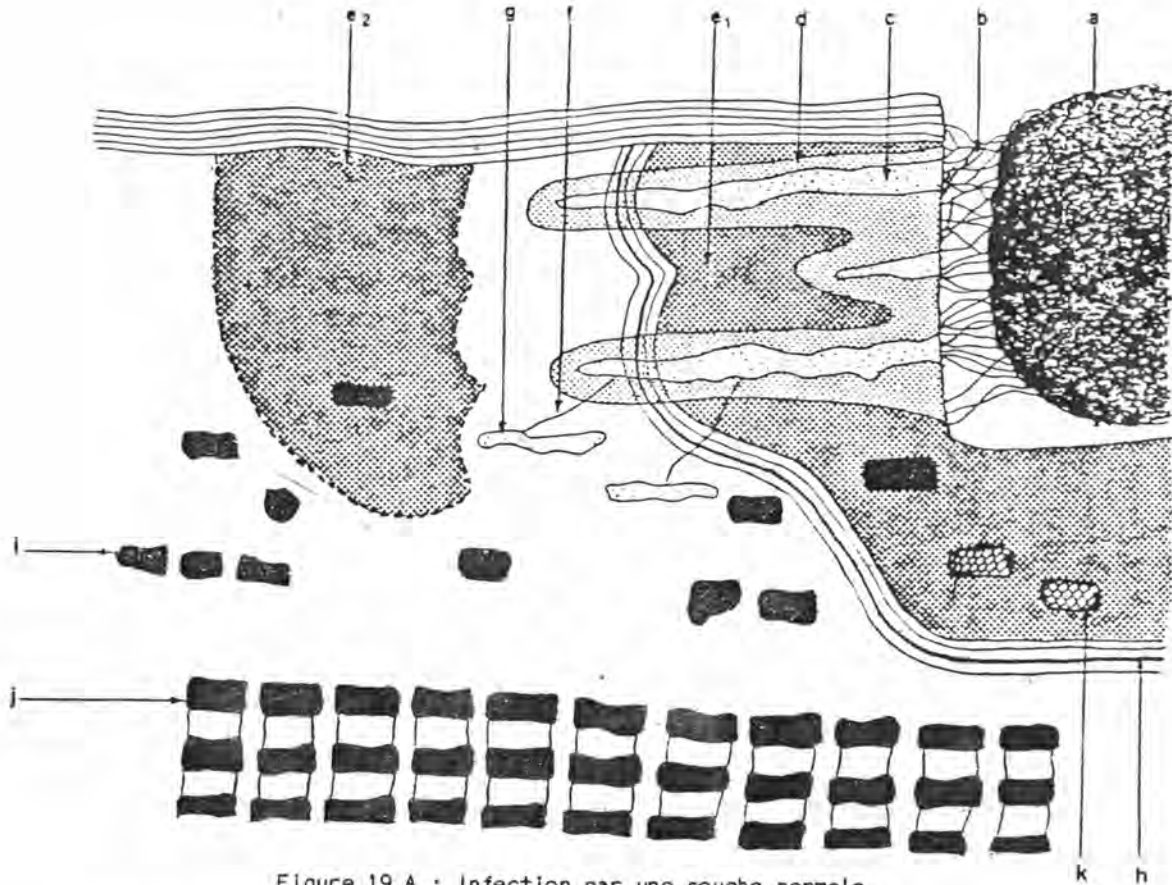


Figure 19 A : Infection par une souche normale

L'inoculum a, a constitué un coussinet d'infection b, qui envoie tangentiellement des masses mycéliennes d'infection c. Les tissus touchés réagissent par élaboration de tannins et gommes de blessure : zone d, puis par un début de lignification partielle des parois cellulaires : zone e1. Des filaments individuels f, essaient pour constituer de nouvelles masses mycéliennes d'infection g. Un périderme réactionnel h, se constitue autour de la lésion. Ce périderme est fait d'une couche de phellème mince (cellules à parois peu subérisées); d'un phellème épais (cellules à parois très subérisées); du phellogène, couche méristématique unicellulaire; d'un phelloderme, cellules restant parenchymateuses. Une seconde zone de cellules, à parois réagissant positivement aux réactifs de la lignine, se constitue plus loin : e2. Des fibres péricycliques i, et libériennes j, complètement lignifiées, arrêtent le mycelium. Des îlots de fibres sclérenchymateuses k, sont induits dans les zones en début de lignification.

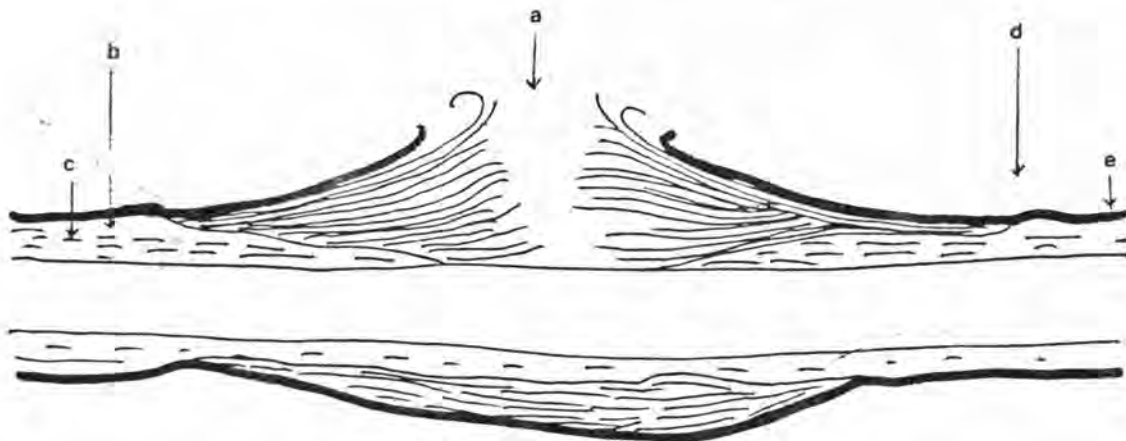


figure 19 B : chancre évolutif

L'infection a eu lieu en a; l'écorce atteinte, composée de feuillets superposés de suber réactionnel et de cellules parenchymateuses colonisées par le champignon et entièrement nécrosées et desséchées, est tombée par petits fragments ou a été enlevée par les insectes. Le bois a été découvert (chancre "à trou"). L'écorce saine b, contient des îlots de sclérenchyme c, qui n'arrêtent pas la progression du parasite; la limite avec la zone atteinte est marquée par une dépression d.

qu'après chélation du calcium. Cette réaction serait assurée par l'acide oxalique : produit du métabolisme du champignon. Dans les tissus de l'hôte, la production de cet acide est maximale au front de la lésion. Après déplacement du calcium, la polygalacturonase pourrait entrer en contact avec son substrat; les parois cellulaires seraient ensuite exposées à l'action d'autres enzymes (qui n'ont pas été jusqu'à présent étudiées chez l'Endothia), attaquant les constituants pariétaux

Selon MC CAROLL, l'acide oxalique pourrait agir sur la perméabilité membranaire; certes, la perméabilité est altérée (la perte d'eau au niveau de la zone gélatineuse en est témoin), mais nous préférons, pour en rendre compte, évoquer le rôle très probable des protéases dont l'Endothia est abondamment pourvu.

Le brunissement des tissus évoqué plus haut, est l'aboutissement très commun d'une réaction de défense correspondant à un accroissement de la teneur des cellules en polyphénols. Ces substances ont un effet dénaturant sur les enzymes pectinolytiques. Le problème est plus complexe, l'activité polyphénolique est vraisemblablement fonction de la nature des molécules génératrices de polyphénols préexistant sous forme de tannins dans l'écorce. Les différences de comportement des espèces en sont le témoin.

NIENSTAEDT (1950) a montré que les C.mollissima, et à un moindre degré les C.crenata, sont riches surtout en tannins phlorogluciniques hydrolysables, alors que chez les espèces sensibles (C.sativa et C.dentata), les tannins condensés catéchiques prédominent.

Récemment, ELKINS (1977) a trouvé que la sensibilité des espèces C.dentata et C.sativa était due à la présence d'hamamélitannin dont les espèces orientales sont dépourvues.

Selon BAZZICHER (1955), les tannins seraient dégradés, sous l'action d'une esterase (tannase) à caractère adaptatif, en phénols susceptibles de se polymériser et de dénaturer les enzymes pectinolytiques.

Le même auteur (1953), rend la diaporthine responsable de l'action pathogène de l'Endothia.

Dans notre équipe, RIOU (1977) a montré que la diaporthine différait le processus de cicatrisation des blessures, suffisamment pour rendre possible leur infection par l'Endothia parasitica.

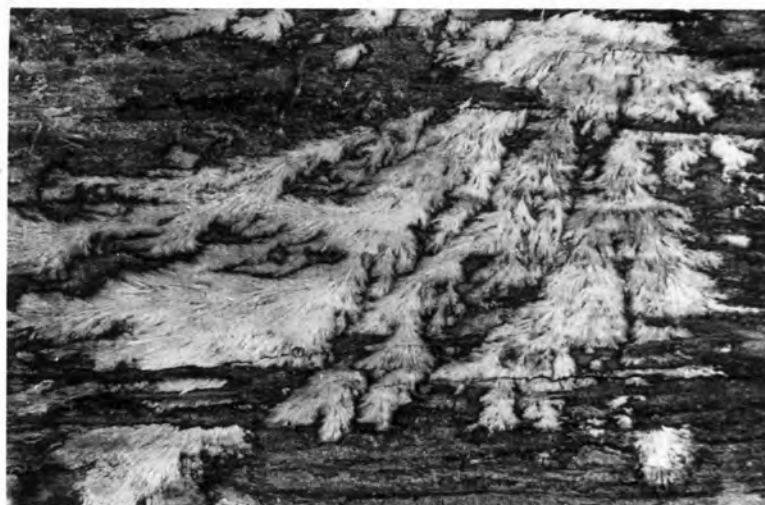
Récemment, LAPLACE (1980), toujours à CLERMONT, a isolé une fraction



A/ chancre évolutif apparu
à l'occasion d'une blessure
d'élagage (remarquer les
pousses adventives à la base)



B/ premières manifestations de
l'infection sur écorce lisse :
le mycelium se développe en
éventails orangés visibles par
transparence sous la cuticule.



C/ Eventails entre les feuillets d'écorce atteinte

spécifique du noircissement des cellules.

BAZZIGHER (1957) rapporte que l'ensemble des métabolites du champignon interviendrait dans la thylose des vaisseaux du xylème mitoyens des parties d'écorce infectée; mais on sait actuellement que des phénomènes beaucoup plus complexes interviennent dans l'obturation des vaisseaux.

La physiologie de l'infection est, sur le plan biochimique, d'une grande complexité :

Selon MC CAROLL (1978), le *C.mollissima* contiendrait dans son écorce interne un inhibiteur protéique spécifique des endopolygalacturonases, deux fois et demi plus actif que celui du *C.dentata*.

Le problème de la résistance spécifique s'est encore compliqué depuis que SAFIYA SAMANN (1979), a détecté dans l'écorce interne du châtaignier chinois, un acide gras insaturé à longue chaîne dont l'action fongistatique contre l'*Endothia parasitica* est particulièrement marquée.

Symptômes précoces

La première phase de l'infection a pour conséquences :

1/ un rougissement de l'écorce tout autour du point de pénétration du parasite. Ce symptôme n'est visible que sur les tiges et branches jeunes à écorce lisse et encore dépourvues du rhytidome caractéristique du châtaignier.

2/ un affaissement de l'écorce tout autour de l'auréole rouge. Plus ou moins accentué selon la vitesse de développement du parasite, cet effondrement dépend à la fois de la virulence de la souche, des conditions climatiques et de l'épaisseur de l'écorce (c'est-à-dire de l'âge de l'organe attaqué); les jeunes tiges sont les plus sensibles.

Symptômes secondaires

Le chancre s'étend plus rapidement dans la direction de l'axe de la tige que latéralement; il en résulte une lésion dont le développement est approximativement une ellipse dont le grand axe est typiquement deux à trois fois le petit axe.

La constitution de couches successives de périderme réactionnel

tend à accroître le diamètre de la branche attaquée : le chancre va donc acquérir une forme "en fuseau". Les tissus morts de surface sont repoussés vers l'extérieur, leur largeur est insuffisante pour encercler la branche de diamètre accru; des fentes, puis des crevasses longitudinales profondes vont se créer.

Sous l'effet du dessèchement, l'écorce malade se soulève d'abord en lames rubanées qui se clivent ensuite en feuillets, puis se fragmentent en tout petits morceaux de 1 à 2 mm de côté, pouvant même aller jusqu'à la limite de visibilité à l'oeil nu (1/10 de mm). Ces fragments sont porteurs des "éventails" mycéliens du parasite; ils constituent des unités infectieuses de dissémination de la maladie beaucoup plus efficaces que les pycnospores.

Le parasite envahit le parenchyme cortical puis le phloème jusqu'au cambium, sans être arrêté par les fibres péricycliques ni par les fibres libériennes. Il ne colonise jamais le xylème: s'il lui arrive d'infecter les premières cellules des rayons ligneux, il ne se développe pas au-delà; il reste essentiellement cortical. Lorsque l'écorce a été détruite sur toute son épaisseur, les péridermes réactionnels ne peuvent plus se former au-dessous d'elle et n'apparaissent qu'autour de la partie infectée.

Sur les tiges d'un diamètre suffisant (de 5 à 7cm minimum), si une plage de cambium a été atteinte et que l'écorce qui la recouvre a disparu, alors que le parasite n'a pas réussi à encercler complètement l'organe, les tissus atteints forment une couronne autour d'un trou central de bois dénudé : nous dénommerons "chancre à trou" ce type de lésion (figure 19 B, page 62).

Comportement du châtaignier en présence de la maladie

Les chancres se développent plus ou moins rapidement selon les conditions du milieu, mais surtout selon l'âge et l'état physiologique de l'organe attaqué.

Les jeunes organes peu lignifiés et subérisés de 2 à 4 cm de diamètre sont en général complètement encerclés en quelques mois, ce qui entraîne la mort de la partie apicale. Or, la destruction annulaire des tissus corticaux ne peut rendre compte à elle seule de cet effet; il faut probablement faire intervenir des actions toxiques et la thylose.

La partie basale produit rarement des bourgeons adventifs.

Sur les tiges et branches de 5 à 15 cm de diamètre, la progression est plus lente, il faut deux à quatre années au champignon pour encercler l'organe.

De nombreux bourgeons adventifs se développent à la base du chancre et produisent des gourmands feuillés qui viennent le masquer. Ces organes n'ont qu'une vie précaire, ils sont tués en général l'année qui suit leur apparition (par invasion de l'écorce qui les porte). Si les tiges sont suffisamment vigoureuses, elles émettront en amont de nouveaux gourmands et le processus recommencera jusqu'à ce que la base du tronc ou du rejet soit atteinte.

Bien que la localisation et l'évolution soient variables, la maladie commence de façon générale par des attaques du sommet, puis les chancres "descendent". Les vieux troncs, chez le châtaignier européen (*C. sativa*), sont protégés par la résistance ontogénique (voir ci-dessous) mais la destruction progressive des branches aboutit indirectement à leur mort : par inanition.

Au fur et à mesure de la disparition de la partie aérienne, la tendance naturelle du châtaignier à rejeter de souche s'accélère. Les chancres apparaissent ensuite sur les nouvelles tiges ainsi produites, dont ils provoquent la mort en quelques années. Généralement, la souche reste vivante et le processus se répète. L'*Endothia* ne tue pas l'arbre mais, bien entendu, anéantit sa production de fruits et perturbe gravement celle du bois.

Les auteurs italiens (BIRAGHI 1951) rapportent que l'évolution de la maladie a amené les cultivateurs à couper les rejets tous les 10 ans : cette opération a déjà été effectuée à 3 ou 4 reprises depuis 1935, ce qui témoigne de la vitalité de la souche de l'arbre. Aux U.S.A. nous avons observé que les grands arbres avaient, tous ou presque, complètement disparu mais les souches sont restées vivantes, donnant naissance à des rejets régulièrement tués entre leur 5e et leur 10e année, et ce depuis l'apparition de la maladie (1904).

Anatomie de la plante malade.

Les stades précoces de l'infection sont décelables à l'examen microscopique.

Dès le 3e jour, les cellules voisines des masses d'infection primaires présentent une accumulation de tanins et un début de lignification des parois cellulaires (réaction positive à la phloroglucine chlorhydrique). Ensuite, le contenu cellulaire brunit, suite à une dégénérescence gommeuse et une imprégnation par des polyphénols.

Au cours des 8 à 10 jours suivants, ces phénomènes s'accroissent sans changer de nature. Dans les cellules situées 2 à 3mm au delà du front de l'infection, la lignification l'emporte sur la dégénérescence cellulaire; au contact de la zone de cellules à parois légèrement lignifiées, un périoderme réactionnel se constitue tout autour des tissus infectés. C'est une réaction capitale pour la compréhension de la morphogénèse des chancres et du phénomène de cicatrisation spontanée,

BRAMBLE a décrit cette modification en employant une série de termes qui sont mentionnés ici entre parenthèses.

Dans le parenchyme cortical se différencie une zone suberophellodermique ("phellogène"), qui produit, vers l'extérieur, des files de cellules dont les parois se subérisent ("phelleme"), et vers l'intérieur, du parenchyme ("phelloderme").

Le "phellogène" comporte quatre assises, le "phelleme" deux zones : la plus externe a des parois faiblement subérisées et minces; la plus interne, des parois épaisses, complètement subérisées. Le "phelloderme" a les caractères du parenchyme cortical normal.

L'ensemble de ces formations est donc tout à fait semblable aux barrières classiques "de cicatrisation" dont l'effet devrait être d'isoler les parties atteintes du reste du cortex, de faire barrage aux filaments mycéliens et d'empêcher la diffusion des métabolites toxiques.

Mais, dans le cas qui nous concerne, des hyphes individuelles se détachent de la masse mycélienne, prolifèrent en toutes directions et vont former plus profondément dans l'écorce des palmettes de 2ème génération avant que la subérisation du "phelleme" ne soit achevée.

Après débordement de la barrière de périoderme réactionnel, le champignon se développera par vagues successives, induisant de plus en plus profondément les mêmes processus de défense que ceux qui précèdent.

La lésion va donc être finalement constituée par une superposition de lames de périoderme réactionnel supportant des palmettes fongiques et des restes de tissus altérés.

Sur des organes végétaux plus âgés (d'un diamètre supérieur à

10 cm), des flots de sclérenchyme viennent compléter les amas de fibres péricycliques lignifiées. Il peut se constituer un anneau complet, susceptible de freiner la marche de l'infection.

Sur les tiges de très gros diamètre (plus de 20 cm), les formations sclérenchymateuses peuvent assurer une protection efficace du cortex sous-jacent, qui restera vivant et continuera son accroissement. C'est ce que BAZZIGHER dénomme "résistance ontogénique" (communication personnelle).

B - LA CICATRISATION SPONTANÉE DES CHANCRES

Nous avons eu l'occasion d'observer pour la première fois en 1964, les chancres cicatrisés décrits en Italie par A. BIRAGHI (1951). Par la suite, des observations semblables ont été faites dans les différentes régions castanêicoles de France, (particulièrement Pays Basque et Massif des Maures), ainsi qu'en Italie dans plusieurs provinces.

Premières prospections des châtaigneraies italiennes et

=====

françaises

=====

La cicatrisation dans les taillis

En 1964, dans la région de BERGAME en Lombardie (communes de BRINZIO, PONTIDA et BRENNNA), les parcelles étudiées étaient constituées par de jeunes taillis (tiges de 10 cm de diamètre au maximum, à écorce lisse) provenant du recépage de vieilles châtaigneraies fruitières effectué à la suite d'attaque d'Endothia. Il s'agissait donc d'une zone où la maladie avait eu, autrefois, un développement épidémique grave.

Dès l'abord, ces peuplements étaient remarquables parce que les chancres y étaient visibles de loin, ce qui s'expliquait par l'absence des "gourmands" feuillus qui, normalement, se différencient à la base des lésions et viennent les masquer.

A BRINZIO et BRENNNA, on observait des chancres sur les rejets de tous âges : faciès épidémiologique "normal" (figure 21 A).



A/ chancre évolutif : on remarque le craquellement de l'écorce et les pousses adventives à la base.
B/ chancre cicatriciel : les parties d'écorce atteintes sont éliminées avec le rhytidome



C/ chancre évolutif sur C. sativa : On remarquera les rejets adventifs et la dénudation du bois .
D/ le même chancre, deux ans après la photographie C. Située au voisinage de chancres ayant servi à des expériences d'exclusion, cette lésion s'est partiellement cicatrisée par dissémination spontanée de souches hypovirulentes introduites. Le trou est partiellement refermé par des bourrelets et l'écorce de la partie supérieure montre le même aspect que dans la photo B.

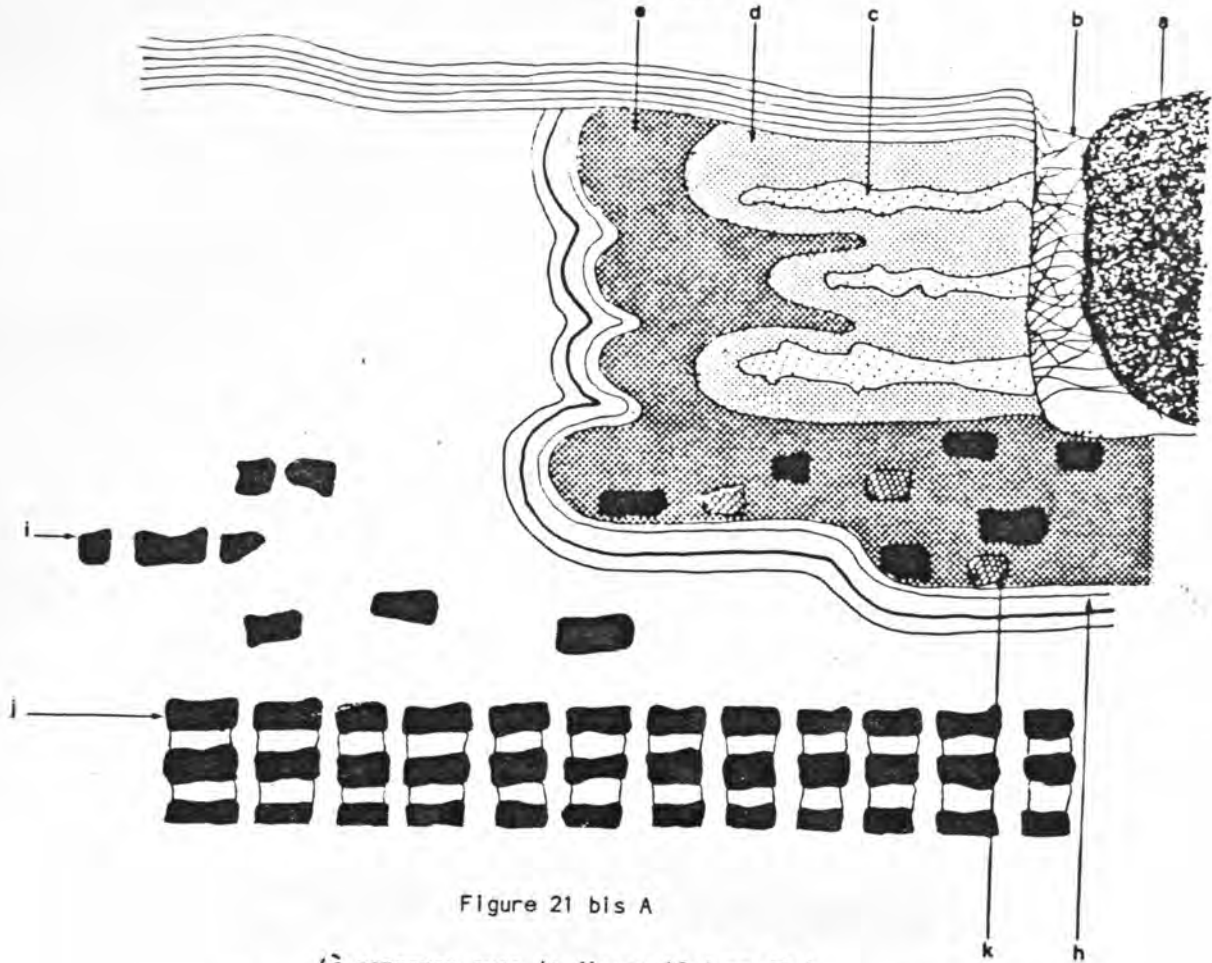


Figure 21 bis A

(à comparer avec la figure 19 A -p.62-)
la barrière suberophellodermique précocement subérisée
arrête les masses d'infection.

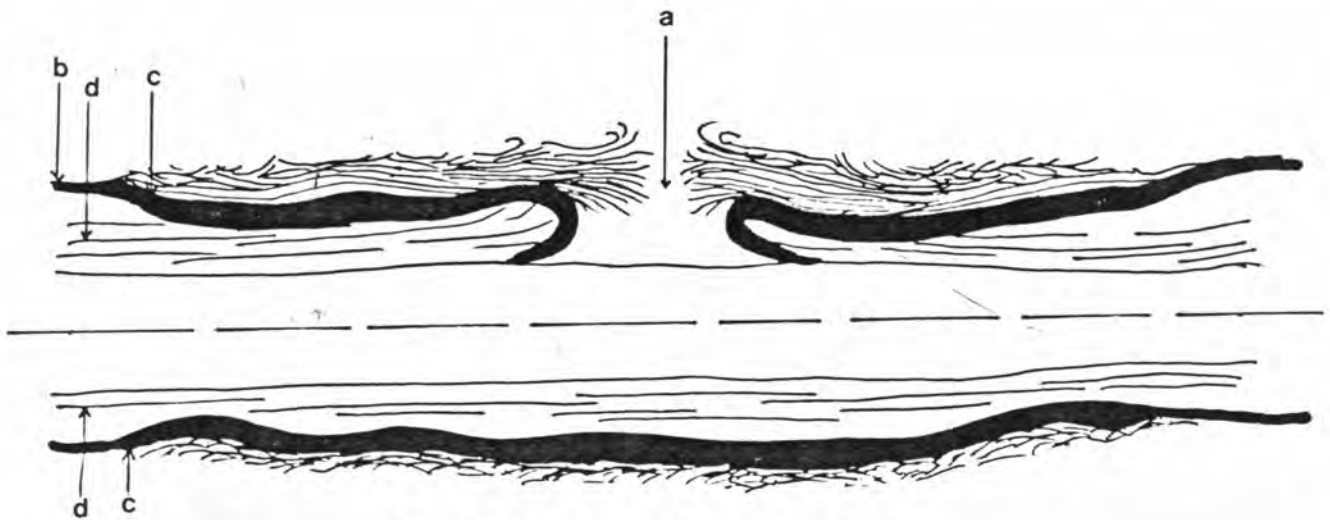


Figure 21 bis B : Chancre à 2 périodes

L'infection a eu lieu en a; un suberophelloderme très
subérisé b, limite l'infection et rejette les parties
atteintes à l'extérieur c; des fibres lignifiées se
différencient dans le cortex.d

Par contre, à PONTIDA, les rejets jeunes (1 à 4 ans) n'avaient pratiquement pas été attaqués, alors que les plus âgés étaient presque tous atteints : faciès inhabituel.

Sur la très grande majorité des chancres, l'écorce n'avait pas la couleur rouge caractéristique ni la surface crevassée : elle était noire et écailleuse. De plus, les tiges atteintes, bien que pouvant comporter plusieurs lésions superposées sur 3 à 4 mètres de hauteur, ne présentaient aucun symptôme de dépérissement, ni flétrissement des feuilles, ni mortalité des branches supérieures. Rapprochée de l'absence de gourmands, cette observation laissait à penser que la circulation de la sève n'était pas perturbée par la maladie (figure 21 B).

Si l'on cherche à reconstituer l'historique de leur évolution, les chancres peuvent se classer en deux catégories différentes.

Chancres "à deux périodes" : certains présentaient la marque d'une évolution antérieure "normale"; en effet, au centre, le bois était complètement découvert par disparition de l'écorce (chancre à trou typique). Ce trou central était entouré de gros bourrelets cicatriciels, à surface lisse et claire, indemnes d'infection. Au-delà, l'écorce était marquée de crevasses longitudinales peu profondes, son rhytidome était écailleux et noir, la lésion s'étendait sur une très grande longueur : plus de 10 fois le diamètre de la tige (figures 21 C et D).

Au sondage, le champignon ne pouvait être détecté, sous forme de palmettes, que dans les premiers millimètres du cortex; en dessous se trouvait une zone de tissus très durs, d'un blanc nacré.

L'ensemble de ces caractères ne correspond pas au faciès typique des lésions.

Ces chancres avaient donc eu dans le passé un développement évolutif typique, puis un changement s'était produit. Nous les dénommerons chancres "à deux périodes".

Chancres "à une période" : une autre catégorie de lésions était constituée par des altérations superficielles semblables aux précédentes mais sans dénudation du xylème. Les chancres étaient très longs et légèrement renflés dans leur partie centrale. Ils ne semblaient donc pas avoir connu antérieurement un stade évolutif : ce sont des "chancres à une période".

Manifestement, ces deux catégories d'altérations étaient en voie de cicatrisation. Elles méritaient le qualificatif de chancres "cicatriciels".

A l'innocuité du parasite pour les rejets s'ajoutait une régression de la maladie, puisque le nombre d'attaques sur les jeunes tiges avait diminué.

Entre les deux catégories de chancres, une différence bien nette doit être soulignée :

- Pour la première, entre les deux périodes, un évènement est venu changer le cours de l'évolution.

Pour la seconde, ils avaient d'emblée un développement restreint aux couches superficielles de l'écorce, et sans nocivité pour la plante. La figure 21 bis B, page 70 bis, schématise ces dispositions. On la comparera à la figure 19 B, page 62.

Dans les deux cas, nous sommes en présence d'un phénomène nouveau.

Chez certains chancres de ces deux catégories, le mycélium ne pénétrait pas dans les tissus vivants, mais restait localisé dans des portions de rhytidome complètement desséchées. En frottant leur surface, on pouvait faire tomber les écailles noires qui les recouvraient; le cortex ainsi mis à nu était identique au rhytidome rugueux des tiges âgées du châtaignier sain.

De tels chancres méritent le qualificatif de "cicatrisés". Cette appellation est particulièrement justifiée quand il s'agit de ceux de la 1ère catégorie : à 2 périodes, dont les lésions anciennes sont complètement obturées par des bourrelets cicatriciels.

Autres chancres : dans les châtaigneraies de la région visitée, nous avons eu beaucoup de difficultés à trouver des chancres évolutifs typiques : sur plusieurs hectares prospectés, nous n'avons trouvé qu'un chancre à BRENNÀ, un à BRINZIO; mais aucun à PONTIDA. Nous avons observé des lésions dont une partie présentait l'aspect évolutif, et le reste, l'aspect cicatriciel : chancres "mosaïques".

Nous disposions donc d'un matériel d'étude où tous les "degrés de cicatrisation" étaient représentés.

Selon l'avis de A. BIRAGHI, la commune de PONTIDA représentait le stade final du processus : les cicatrisations étaient suffisamment

anciennes pour s'être généralisées, d'où l'absence de chancres évolutifs. De plus, la maladie (au moins sa forme virulente) avait cessé de s'y disséminer; la grande rareté des lésions sur les rejets de moins de 4 ans en était la conséquence. Dans les autres communes, on supposait les phénomènes de cicatrisation plus récents.

Chancres cicatriciels sur jeunes arbres de semis

Un autre fait mérite attention : dans une ancienne châtaigneraie fruitière non recépée et enrésinée (par du Pin sylvestre), de jeunes semis spontanés de 5 à 10 ans s'étaient établis.

A la base de ces plants, on constatait la présence de lésions cicatrisées du type "à une période".

Le phénomène de cicatrisation n'est donc pas l'apanage des rejets de souche. Cette observation allait à l'encontre de la première hypothèse évoquée par A. BIRAGHI, selon laquelle la cicatrisation serait due à une modification physiologique de l'arbre consécutive au recépage.

Chancres cicatrisés en France

Nous avons aussitôt recherché si des observations analogues étaient possibles dans les châtaigneraies de plusieurs départements.

Nous avons pu trouver dans le Massif des Maures un arbre présentant des chancres tout à fait semblables à ceux observés en Italie et, au Pays Basque, plusieurs (trois bien caractérisés et deux de type "mosaïque").

Prospections ultérieures

En 1967, nous avons exploré les châtaigneraies de la région de GENES, de FLORENCE et de CUNEO; les cas de cicatrisation spontanée y étaient aussi nombreux que trois ans auparavant à BERGAME. Comme A. BIRAGHI l'avait fait récemment remarquer, ils n'étaient pas l'apanage des arbres de taillis.

Dans les 5 années qui suivirent, nous avons prospecté les châtaigneraies françaises mais sans trouver de cas typiques de cicatrisation spontanée.

Nous avons régulièrement prélevé des échantillons d'écorce, et parfois des chancres entiers pour examen au laboratoire.

En résumé, il existe au moins 3 types de chancres :

1/ les évolutifs : faciès typique de la maladie, ils prédominent en France (avec la modalité particulière du "chancre à trou").

2/ les cicatriciels : l'invasion y est restreinte aux zones superficielles de l'écorce; ce sont, soit des lésions évolutives dans le passé, puis leur développement a subi un changement; ou encore des chancres apparus d'emblée sous la forme nouvelle (avec les modalités de : "chancres à deux périodes", "à une période", et "mosaïque").

3/ les cicatrisés : le parasite n'existe plus que dans le rhytidome. Ces chancres semblent représenter le terme ultime d'une évolution (avec les mêmes modalités que précédemment).

Les deux derniers sont fréquents en ITALIE, dans les régions où la maladie est en régression, mais très rares en FRANCE.

Les chancres "mosaïques" composés d'un mélange de parties cicatricielles et évolutives représentent un état essentiellement transitoire. Le tableau 1 récapitule ces caractéristiques.

TABEAU 1 : Caractéristiques comparées des chancres

Type évolutif	Type cicatriciel
Surface du cortex rouge	Surface du cortex noire
Dépression à la marge	Marge souvent renflée
Crevasses longitudinales profondes	Crevasses peu profondes
Ecorce déchirée en lanières	Ecorce entière adhérente
Eventails à toute profondeur	Eventails en surface seulement
Pas d'écorce de néoformation	Ecorce de néoformation dure, nacrée
Renflement médian très prononcé	Chancre en fuseau très effilé
Chancres courts : longueur 2 à 3 fois le diamètre	Lésions très longues : 10 à 20 fois le diamètre
Rejets feuillus nombreux à la base	Pas de rejets à la base de la lésion
Partie apicale dépérissante	Pas de dépérissement apical
Barrières de liège incomplètes et peu subérifiées	Barrières de liège continues et très fortement subérifiées
Ilots de fibres péricycliques peu nombreux, petits, peu lignifiés	Ilôts de fibres péricycliques lignifiés, nombreux et gros

Etude comparée des chancres
=====

Quelque soit l'origine géographique et la date de prélèvement, les structures anatomiques des chancres cicatriciels, cicatrisés, ou des parties cicatricielles des chancres "mosaïques", sont les mêmes. Les tissus infectés par le mycélium restent localisés à la périphérie de l'écorce: jamais à plus de 5 mm de profondeur. L'infection est donc plus superficielle que dans les chancres évolutifs. Les tissus nécrosés sont entourés d'une zone de cellules à parois plus fortement lignifiées (coloration à la phloroglucine chlorhydrique et réaction de MAULE plus intenses), qui s'étend sur 2 à 3 mm. Autour de cette zone, un periderme réactionnel épais et plus fortement subérisé (coloration au Soudan III plus intense), peut être mis en évidence. Enfin, un anneau de sclérenchyme protège la partie interne saine du cortex. La figure 21bis A, page 70bis schématise les dispositions histologiques des premiers stades de l'infection, on la comparera avec la figure 19 A, page 62.

La différence avec les chancres évolutifs tient donc essentiellement au fait que la barrière de liège réactionnelle se subérise complètement avant que le champignon n'ait eu le temps de s'installer dans les assises profondes. Les défenses naturelles du châtaignier, inefficaces dans le cas des chancres évolutifs, sont ici capables de s'opposer à la progression du champignon. La formation d'un abondant subero-phello-derme, dont est issu un rhytidome important, même sur des tiges peu âgées (de 3 à 5 ans), se présente comme une manifestation de sénescence prématurée; la formation d'un anneau de sclérenchyme va dans le même sens.

Le problème est évidemment de comprendre cette modification dans le comportement de l'arbre vis-à-vis de son parasite, et de rechercher quelles peuvent en être les causes.

C - LES SOUCHES "B"

Recherche, caractérisation et localisation du parasite
=====

dans les différents types de chancres.
=====

Nous avons prélevé à BERGAME, puis en France, des lambeaux d'écorce en plusieurs points des lésions. Chaque chancre a été réper-

torié dans l'une des trois classes : évolutif, cicatriciel, cicatrisé.

Pour les types "mosaïques", la distinction était faite entre la partie évolutive et la partie cicatricielle.

A partir des échantillons, on a réalisé des isolements à raison d'une vingtaine d'implants par chancre (plus, dans la mesure du possible).

Travaux initiaux (1964-1965) :

Mise en évidence : contrairement à ce que nous avions obtenu jusque là, les cultures obtenues de ces prélèvements n'étaient pas homogènes. On pouvait distinguer :

- 1/ celles de l'Endothia parasitica "Normal", tel que décrit, caractérisé par la formation de pycnides colorées dans les 14 jours de développement en conditions standard.
- 2/ d'autres, semblables aux premières par leur mycélium (même aspect, même vitesse de croissance) mais, au 14^e jour, aucune pycnide ne s'était différenciée; selon les cas, les thalles présentaient une marge entière ou irrégulièrement lobée. Après un mois, aucune fructification n'était apparue (figure 21ter, page 76bis).

La différence entre ces deux types culturaux était si importante que, pendant les premières semaines, nous avons cru être en présence d'une espèce différente. Cependant, à l'examen microscopique, la morphologie du mycelium se révélait très voisine, sinon identique (l'étude des propriétés pathogènes confirmera cette identité spécifique).

Corrélation avec la cicatrisation : nous avons, pour les trois types de chancres, établi les pourcentages d'isolements donnant des cultures typiques et des cultures dépourvues de pycnides.

Pour la commodité de l'exposé, nous désignerons respectivement les 2 types par :

"N" (l'Endothia normal)

"B" (le second).

Le tableau 2 donne les résultats obtenus en ITALIE et en FRANCE.

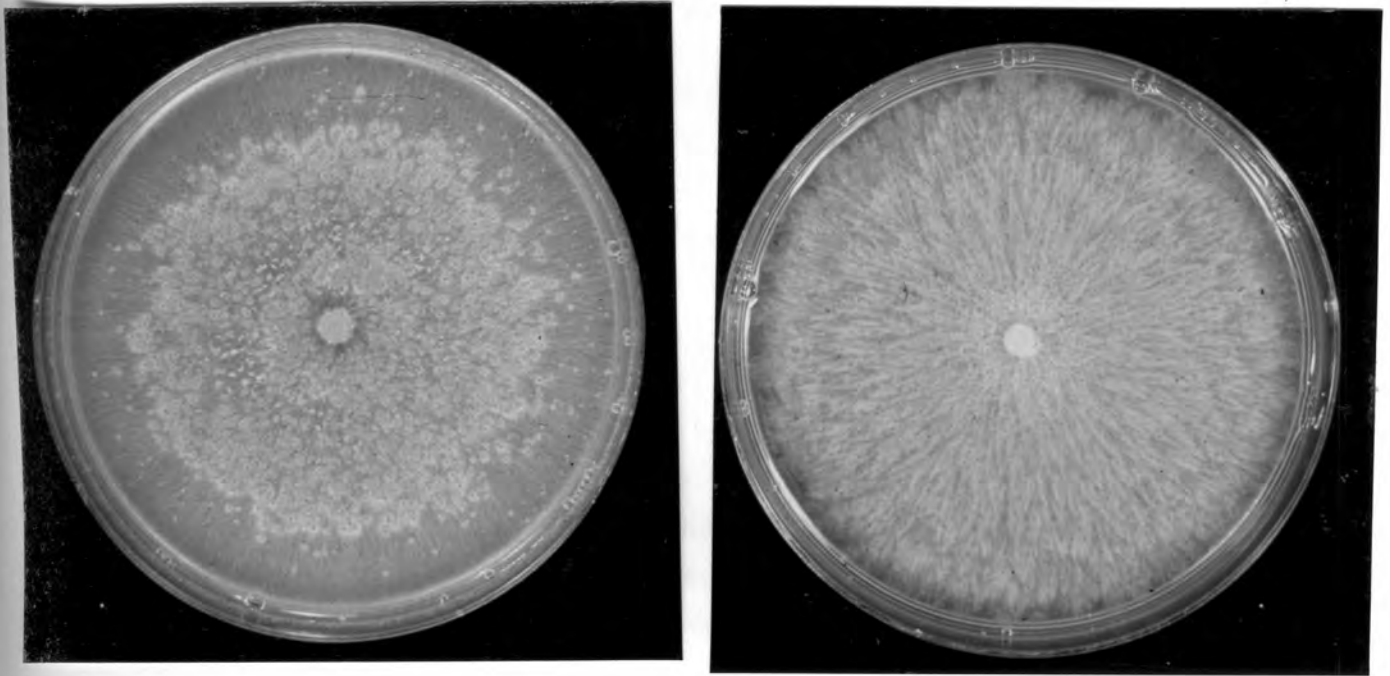


Figure 21 ter

Souches N et B cultivées dans des conditions identiques
(20 jours à l'obscurité)

TABLEAU 2

Résultats des isolements (prospection 1964-65)

I Chancres de LOMBARDIE (1964)

Description : Classe					Pourcentage de		Pourcentage de	
du chancre ou du fragment					cultures B		cult. stériles	
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	
BRINZIO								
1	1,2m.	2P	cicatrisé		69 %	29		24 %
2	0,6m.	2P	cicatriciel		100 %	31		31 %
3	1,5m.	2P	(part.cicat. 60%		87 %	23		29 %
			(part.évolut.40%		10 %	21		0 %
PONTIDA								
1	2,5m	1P	cicatrisé		100 %	17		7 %
2	3,1m	2P	(part.cicat. 80%		60 %	20		50 %
			M (part.évolut.20%		17 %	41		0 %
3	0,75m	2P	(part.cicat..90%		76 %	21		0 %
			M (part.évolut.10%		6 %	33		0 %
arbres de semis								
4	1,65m	1P	cicatriciel		93 %	28		46 %
5	0,35m	1P	évolutif		59 %	17		37 %
BRENNNA								
1	2,60m	1P	cicatriciel		94 %	33		32 %
2	0,20m	2P	évolutif		6 %	32		0 %
3	0,90m	2P	part.cicat. 50%		44 %	36		0 %
			(M part.évolut.50%		7 %	43		0 %

II Chancres de FRANCE (1965)

Description : Classe du chancre ou du fragment					Pourcentage de cultures B		Pourcentage de cult. stériles
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
LES MAYONS (Massif des Maures VAR)							
1	3,60m	2P	cicatriciel		80 %	20	60 %
2	0,18m	1P	évolutif		7 %	42	0 %
3	3,25m	2P	cicatrisé		94 %	33	51 %
ASSON (Pays Basque Français)							
1	1,70m	1P	cicatriciel		100 %	27	89 %
2	0,30m	1P	évolutif		0 %	19	0 %
NAY (Pays Basque Français)							
1	1,20m	2P	cicatriciel		81 %	21	7 %
2	1,80m	1P	évolutif		7 %	42	0 %

Légende: (1) N° d'ordre.

(2) Longueur du chancre.

(3) Type morphologique de lésion : 2P = chancre à 2 périodes ;
1P = chancre à 1 période ; M = chancre mosaïque.

(4) Classe d'évolution.

(5) Proportion relative de l'aire du chancre se trouvant dans
l'état d'évolution spécifié.

(6) % de cultures B obtenues par rapport aux cultures fertiles.

(7) Nombre de prélèvements effectués.

(8) Proportion de prélèvements stériles (sans Endothia) par
rapport au total.

La consultation du tableau 2 (I et II) appelle les observations suivantes :

Pour l'ITALIE

1/ la fréquence des isolements B est maximale en Italie pour les chancres cicatrisés ou en voie de l'être, et plus particulièrement dans la commune de PONTIDA. On se souvient qu'en cette localité :

- a) - les tiges jeunes sont très rarement attaquées
- b) - nous n'avons pas trouvé de chancre évolutif
- c) - on y observe des semis naturels avec des chancres cicatriciels
- d) - A. BIRAGHI considère que l'on est en présence du stade ultime de régression de la maladie.

2/ il y a apparemment une corrélation entre la fréquence des isolements de B et le degré de régression de l'épidémie.

3/ la fréquence des isolements B est plus forte lorsqu'on part de chancres cicatrisés; elle est à peine moindre pour les cicatriciels.

4/ elle est basse à très basse pour les évolutifs ou les parties évolutives des chancres "mosaïques".

5/ elle n'est pas nulle pour les chancres évolutifs.

Pour la FRANCE

Dans les trois communes étudiées, il est possible d'isoler des souches B mais beaucoup moins fréquemment qu'en Italie. Dans toutes les autres localités françaises prospectées, à la date des expériences, il n'y avait pas de cicatrisation spontanée ni de souches B.

La fréquence d'isolement du type B est directement corrélée au phénomène de cicatrisation.

Travaux postérieurs à 1965

De 1966 à 1976, nous avons effectué des isolements à partir de chancres classés préalablement dans les 3 catégories.

Nous reconnaitrons 3 aires géographiques :

1/ celle où le phénomène de cicatrisation spontanée s'est manifesté, que nous appellerons "aire cicatricielle" : régions de CUNEO, BERGAME, GENES, FLORENCE et NAPLES, à laquelle il convient d'adjoindre les trois localités françaises : les MAYONS dans le Var, ASSON et NAY au Pays Basque.

2/ l'aire "évolutive", où des phénomènes de cicatrisation spontanée n'avaient pas été observés avant notre prospection (1974). Elle comprend tous les départements castanéicoles français, y compris la Corse, à l'exception des trois communes citées plus haut.

3/ l'aire "traitee" : ayant introduit des souches B dans les châtaigneraies du Massif des Maures et dans certains départements cévenols (dès 1967), nous considérons que ces régions ont subi une modification du fait de ces introductions.

Les cultures résultant des isolements ont été classées en N et B, conformément aux critères définis antérieurement.

Le tableau 3 donne, pour chaque type et chaque région, la fréquence relative des chancres ayant permis l'isolement de thalles B.

TABLEAU 3

Résultats des Isolements (Prospections postérieures à 1965)

	Total	Nombre de chancres ayant permis l'isolement de la souche B
Aire "CICATRICIELLE"		
chancres évolutifs	45	17
chancres cicatriciels	34	24
chancres cicatrisés	11	11
Aire "EVOLUTIVE"		
chancres évolutifs	920	6
chancres cicatriciels	56	10
Aire "TRAITEE"		
chancres évolutifs	3 377	15
chancres cicatriciels	202	188
chancres cicatrisés	39	33

L'examen du tableau 3 amène les remarques suivantes :

1°/ Présence de souches "B" dans des chancres évolutifs : ce fait est plus fréquent (31% des cas) en aire "cicatricielle" que dans l'aire "évolutive" (0,06%).

2°/ Dans les chancres cicatriciels, on n'isole pas toujours le type B, ce qui peut être attribué :

d'une part, à une discontinuité dans la répartition du thalle B dans les tissus;

d'autre part, à la mauvaise croissance "in vitro" de certaines souches de ce type.

Enfin, chez de nombreux sujets vigoureux, il peut y avoir un très fort développement des assises subero-phellodermiques, avec un ralentissement temporaire de la vitesse d'invasion du mycélium.(1)

De tels chancres peuvent présenter temporairement un aspect "cicatriciel", alors qu'ils sont dûs à une souche "N". La classification dans les trois groupes est toujours entachée d'une part d'arbitraire. Cependant, si on la confronte avec le devenir des chancres, on peut établir que, à terme :

- les chancres classés "évolutifs" ont de fortes chances d'entraîner la mort de la branche.
- les chancres "cicatriciels" ont une probabilité élevée de se cicatriser.

Un travail de notation paramétrique plus précis permettra une classification plus étroitement prévisionnelle (ces notions seront développées dans l'étude de l'épidémiologie).

(1) Nous verrons aussi que, depuis quelques années, sont apparues de nouvelles souches de morphologie N mais dont la virulence est celle de B

CONCLUSIONS

=====

Deux phénomènes, mis en évidence l'un par l'observation, l'autre par le travail d'isolements, apparaissent de façon conjointe :

- la guérison de la maladie
- la présence du type B.

La cicatrisation des chancres n'est pas en soi un phénomène exceptionnel; mais ce qui est nouveau, c'est que la maladie se soit développée pendant quelques années sous forme de lésions indéfiniment évolutives avant que la situation ne changeât brusquement.

Il est difficile de dater cet événement : l'observation de BIRAGHI en 1950 correspondait à une époque où le phénomène était généralisé dans les plantations du centre de l'Italie; il est vraisemblable qu'il était déjà fort ancien.

Son originalité réside encore en ce que la cicatrisation se soit largement répandue dans cette région, avec comme résultante la réduction de la gravité de la maladie au niveau d'une innocuité pratique.

La mise en évidence d'une nouvelle forme du parasite dépourvue de plusieurs fonctions constitue un fait original qui resterait de peu de signification s'il n'était aussi fréquemment associé à la cicatrisation spontanée, d'une part, et si d'autre part sa fréquence n'était corrélée avec le degré de cicatrisation des chancres.

La fréquence des isolements de type B est corrélative au degré de guérison de la maladie.

Peut-on affirmer qu'il y ait une relation de cause à effet entre les deux phénomènes : les souches B ayant provoqué la guérison des chancres ? .

Certainement pas dans l'état d'avancement de l'exposé. Il pourrait s'agir d'une convergence, d'une corrélation au sens strictement statistique du terme.

Avant de pouvoir affirmer que la relation est d'ordre biologique, il est nécessaire d'étudier dans des dispositifs expérimentaux les propriétés pathogéniques des souches B et leurs interactions in-vivo avec les N, c'est à dire leur action sur la maladie.

L'apparition des souches B reste une éventualité rare; elle n'a été relevée que dans les zones les plus anciennement atteintes :

- aux alentours de GENES, lieu d'introduction de la maladie en Europe ;

- dans le massif des MAURES, premier point d'entrée probable de l'Endothia en France ;

- dans le Pays Basque français, c'est à dire à proximité de la Viscaya où le parasite fut détecté en 1947 par les phytopathologistes espagnols (ELORRIETA 1949).

Récemment (1979) les chercheurs américains Lawrence BREWER et Jack ELLISTON ont découvert dans l'état du Michigan des souches très voisines par leurs caractères (1). Il est impossible de préciser si toutes ces souches se sont dispersées à partir d'une origine unique ou si elles sont apparues de façon isolée et endogène aux différents points où elles furent détectées.

(1) cité par Beverly Karplus HARTLINE dans SCIENCE, volume 209, 1980.

CHAPITRE III

PROPRIETES DES SOUCHES B

A - ETUDE COMPAREE DES SOUCHES N et B

COMPARAISON DE L'ACTIVITE PATHOGENE DES DEUX TYPES
La notion d'hypovirulence.
Discussion sur la notion d'hypovirulence.

INTERACTION IN VIVO ENTRE SOUCHES N ET B

Inoculations simultanées, la protection.
Resultats.

Evolution

Réisolement du parasite depuis les lésions.

Réinoculations

Modalités de la protection

Inoculations consécutives : l'exclusion.

Résultats

Evolution

Modalités de l'exclusion.

Réisolements et réinoculations.

CONCLUSION ET DISCUSSION SUR L'ACTIVITE PATHOGENE DES 2 TYPES.

B - LE CARACTERE TRANSMISSIBLE DE LA MORPHOLOGIE "B"

DESCRIPTION DES CONFRONTATIONS ENTRE THALLE B ET N

Absence d'interaction entre les thalles.

Interaction régulière entre N et B.

Interaction aléatoire entre les deux thalles.

ETUDE DES CARACTERES CULTURAUX DES DIFFERENTS SECTEURS.

Cas des confrontations sans interaction.

Cas des interactions régulières.

Prélèvements à la marge du thalle.

Prélèvements à des distances fixes des implants.

Cas des interactions aléatoires.

Variation des cultures issues des secteurs intermédiaires

Le problème de la modification

Etudes à partir de mutants marqués

C - CONDITIONS DE L'INTERACTION

NECESSITE DU CONTACT PHYSIQUE DES THALLES.

Eloignement des implants.

Barrières mécaniques

LA "COMPATIBILITE" DES SOUCHES .

Conclusion et discussion sur la transmission de la morphologie B.

ETUDE DES ANASTOMOSES ENTRE THALLES N ET B.

Devenir des anastomoses.

Les anastomoses "compatibles".

Les anastomoses "incompatibles".

Conclusion sur le phénomène d'anastomose.

CONCLUSIONS



Figure 22 : Expérience d'Inoculation comparative pour la mesure de la virulence des souches (à Clermont)

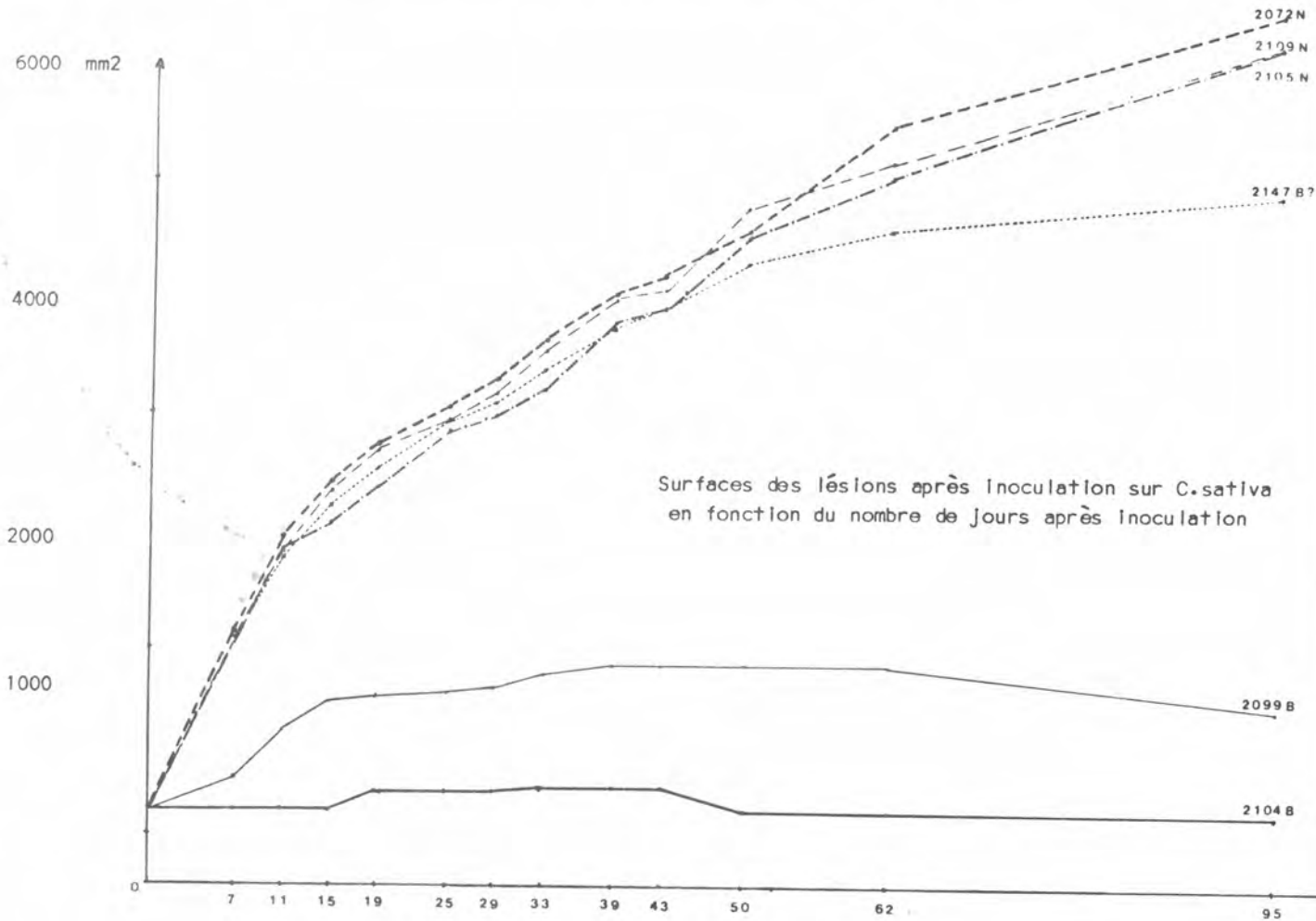


Figure 23 : Courbes d'évolution des lésions pour trois souches N et Deux B .. (2147 B? représente le type dit "américain" - voir p.97-)

PROPRIETES DES SOUCHES B

A - ETUDE COMPAREE DES SOUCHES N et B

COMPARAISON DE L'ACTIVITE PATHOGENE DES DEUX TYPES
=====

La notion d'hypovirulence.
=====

Des inoculations furent effectuées à CLERMONT, sur tiges de C.sativa de 5 ans de 7 cm de diamètre, à écorce lisse et verte -rejets de souche recépés en 1959- (figure 22). Il s'agissait de confirmer l'identité du champignon B et de comparer ses activités pathogènes à celles du type N inoculé au même moment. Dans chaque cas, l'essai portait sur plusieurs souches N, dont une au moins originaire de la même région que la souche B expérimentée, et un témoin de référence N 935 (de l'Ardèche).

Au 10^e jour suivant l'inoculation de la souche B, on constate l'apparition d'une auréole rouge autour de la plaie; au 20^e ème, la périphérie de l'auréole devient légèrement proéminente. Après un mois et demi, des bourrelets cicatriciels encerclent la lésion qui ne dépasse pas 20 mm de diamètre; le trou d'inoculation est entièrement obturé par un cal de néoformation. Au cours des mois suivants, aucune évolution n'est observée. En soulevant l'écorce rouge centrale, on constate la présence des palmettes orangées caractéristiques de l'E.parasitica.

L'examen anatomique établit que la partie d'écorce infectée est circonscrite par un suberophelloderme épais et bien subérifié.

Les réactions qui limitent le développement du mycélium du type B sont donc de même nature que celles décrites dans le phénomène de cicatrisation spontanée. (se reporter au tableau comparatif n°1, page 74, et à la figure 19 A, page 62, pour la description anatomique).

Les quatre souches B isolées de BERGAME, la souche isolée du Var et les deux du Pays Basque, se comportent de façon identique.

Comparativement, les inoculations de cultures N donnent des lésions différant par : la dépression du cortex en bordure de l'auréole rouge, la nécrose des tissus du trou d'inoculation qui ne s'obture pas par un cal, et surtout, par la vitesse d'évolution (différence illustrée par les courbes de la figure 23).

Les réisolements effectués dans la marge des lésions fournissent des cultures identiques, aussi bien dans le cas des B que dans celui des N, à celles utilisées pour l'inoculation; réinoculées à la plante, elles se comportent exactement comme les souches de départ.

Discussion sur la notion d'hypovirulence.

=====

1/ Les souches B appartiennent bien à l'espèce *Endothia parasitica*; la présence des éventails en est la caractéristique irréfutable.

2/ Les souches B réalisent seulement une partie du cycle de l'infection; elles s'installent dans la plante, y développent les lames d'infection primaires, provoquent la dégénérescence gommeuse des tissus atteints; mais, contrairement aux N, elles ne provoquent ni la dépression périphérique à la marge de la lésion par collapsus des cellules, ni la nécrose; enfin, elles ne sont pas capables de franchir la barrière de liège réactionnelle qu'elles ont induite chez l'hôte.

3/ On peut s'interroger sur la façon de qualifier les propriétés pathogènes des souches B. Selon la terminologie actuellement utilisée par les phytopathologistes francophones, les différences d'ordre quantitatif dans l'intensité des altérations relève de la propriété dite "agressivité", alors que la capacité qualitative de provoquer une altération sur un hôte donné relève de la "virulence" : propriété non quantifiable.

Selon cette nomenclature, en 1980, il convient de qualifier les souches B "d'hypoagressives" puisqu'elles ne réalisent qu'une partie du cycle infectieux.

En 1965, nous leur avons attribué le qualificatif : "hypovirulentes", nous référant à la terminologie en usage chez les bactériologistes. Depuis, différentes publications, à l'étranger notamment, ont repris cette dénomination. De plus, nous considérons que le sens commun du terme "agressivité" évoque une aptitude à l'"attaque";

or, cette qualité n'est nullement affaiblie chez les souches B.

C'est pourquoi nous conserverons le terme "hypovirulence" et l'appliquerons aux souches d'Endothia incapables de poursuivre l'infection au-delà des premières barrières de liège réactionnelles.

INTERACTION IN VIVO ENTRE SOUCHES N ET B

=====

Inoculations simultanées, la protection.

=====

Sur des troncs de rejets de souche (diamètre de 5 à 10 cm), à écorce lisse et verte, on pratique des inoculations en plaçant simultanément dans le même trou d'inoculation une boulette d'inoculum de chacune des deux souches N et B. Des tiges, inoculées avec les souches N ou B seules, servent de témoins.

On mesure régulièrement la surface de la zone d'écorce atteinte qui montre un changement de couleur. L'évolution des boursoufflements de l'écorce jusqu'à la production de bourrelets cicatriciels est également suivie. La fin de l'expérience est marquée par la cicatrisation des lésions ou la mort du rejet. Des essais de réisolements du parasite sont effectués.

Résultats.

=====

Evolution

L'évolution des lésions diffère selon les combinaisons des souches N et B.

Une évolution rapide dans les premières semaines, conduit dans tous les cas à la mort de la tige en quelques mois; dans le cas contraire, on observe après 12 mois l'un des deux évènements suivants : mort de la tige, ou cicatrisation complète de la lésion

Le tableau 4 donne le total des inoculations exécutées et celui des cicatrises observées (les lésions non cicatrisées ont

toutes entraîné la mort de la branche), ainsi que les résultats des réisolements effectués en fin d'expérience dans les chancres cicatrisés seulement (les évolutifs ne fournissant que des cultures N).

TABEAU 4

Proportions de lésions cicatrisées
dans les inoculations simultanées de Souches N et B

Souche N	Souche B	Total étudié	Chancres cicatrisés	Réisolement dans les lésions cicatrisées
1657 (It.)	1658 (It3)	8	8	N + B
1565 (Pb)	1564 (Pb1)	24	24	B
1662 (Var)	1663 (Var)	14	14	B
935 (Ard)	1298 (It2)	25	3	N + B
1662 (Var)	1566 (Pb2)	4	2	N + B
1565 (Pb)	1566 (Pb2)	24	23	B
935 (Ard)	1296 (It1)	28	5	N
1565 (Pb)	1296 (It1)	20	0	
1565 (Pb)	1298 (It2)	18	0	
935 (Ard)	1658 (It3)	4 *	0	
1565 (Pb)	1658 (It3)	3 *	0	
935 (Ard)	1564 (Pb1)	23	1	
935 (Ard)	1566 (Pb2)	24	1	N + B
1657 (It.)	1566 (Pb)	3	1	B
1565 (Pb)	1663 (Var)	4	1	N + B
935 (Ard)	1663 (Var)	4 *	0	
1657 (It.)	1663 (Var)	3	3	N + B

* des chancres évolutifs, on a réisolé N et quelques B

It. : Italie

Pb : Pays basque

On constate qu'une très forte proportion des lésions ont évolué vers la cicatrisation, alors que la souche N, inoculée seule, conduit toujours à la mort, et la souche B, seule, à la cicatrisation.

Mais ce résultat n'est pas constant; il dépend essentiellement des souches inoculées. Pour les trois premières combinaisons, la guérison est constante; pour les trois suivantes, elle est très fréquente; pour les onze dernières enfin, elle est plutôt rare sans être nulle. Ces différences ne peuvent trouver d'explication dans l'état actuel des faits exposés (la notion de compatibilité de souche viendra l'éclairer).

Dans les cas positifs, la lésion évolue comme si la souche B avait été seule; la souche N, pourtant inoculée, ne se manifeste pas. Nous pouvons, en première analyse, dire : "la souche B protège la plante contre l'action pathogène de la souche N".

C'est ce que nous avons appelé "la protection".

Réisolement du parasite depuis les lésions.

Comme l'indique le tableau 4, les résultats sont complexes : des chancres cicatrisés, on isole (cf. les trois premiers exemples) une majorité de thalles B, mais on trouve aussi des N en très faible proportion.

Parfois, il est impossible de réisoler la souche B en dépit du caractère cicatriciel de la lésion (cas de la combinaison 935 + 1296).

Cette situation rappelle les résultats d'isolement à partir des chancres spontanément cicatrisés en Italie et en France. Il arrive aussi qu'on puisse réisoler quelques types B depuis des lésions évolutives.

Réinoculations

Les souches N et B réisolées produisent en inoculation les mêmes résultats que les souches N et B de départ; aucun changement n'est donc intervenu dans leur pouvoir infectieux : les souches N réisolées sont virulentes, les B hypovirulentes.

Modalités de la protection

La protection ne s'exerce pas dans toutes les combinaisons de souches N et B alors que l'hypovirulence était l'apanage de toutes les souches B.

Il devient intéressant d'établir une correspondance entre la nature des combinaisons et le phénomène de protection; c'est ce qu'établit le tableau 5 qui exploite les résultats présentés au tableau précédent.

TABLEAU 5
Phénomène de protection dans les combinaisons de souches N et B
Rapport du nombre de lésions cicatrisées au total étudié
(expériences 1965-1966)

SOUCHE B	SOUCHE N			
	1657 Italie	1565 P. basque	1662 Var	935 Ardèche
1296 It 1	x	0/20	x	5/28
1298 It 2	x	0/18	x	3/25
1658 It 3	8/8 **	0/3	x	0/4
1564 Pb 1	x	24/24 **	x	1/23
1566 Pb 2	1/3	23/24 **	2/4	1/24
1663 Var	3/3	1/4	14/14 **	0/4

** Souches N et B originaires de la même région

x Combinaison non effectuée

Dans ces expériences, toute souche B de même origine géographique que la N assure une protection à 100%.

En ce qui concerne la souche N 935 de l'Ardèche, nous ne possédions pas de B de même origine; dans cette situation, les lésions cicatricielles sont rares.

L'inoculation simultanée des 2 types ne correspond pas à une situation naturelle; après avoir montré que les souches B inhibent le développement de la forme virulente, il faut maintenant savoir si ce dernier effet peut s'exercer contre un thalle N déjà établi dans les tissus de la plante depuis un temps suffisamment long pour y avoir provoqué une lésion importante et évolutive.

Inoculations consécutives : l'exclusion.

=====

Dans un premier temps, on provoque un chancre par inoculation d'une souche N; on le laisse évoluer pendant 8 mois : dans les conditions de nos expériences, on obtient, sur des tiges de 10 cm. de diamètre⁽¹⁾, des lésions de 15 à 20 cm. de long.

Dans un deuxième temps, on "surinocule" une souche "B" sur le pourtour du chancre (on place l'inoculum dans des trous pratiqués tous les 2 centimètres sur toute la marge de la partie atteinte; dans les témoins, on laisse le trou vide).

Résultats

=====

Evolution

Le tableau 6 récapitule les résultats de quelques expériences effectuées entre 1966 et 1968.

Après un an, la partie malade est physiquement "EXCLUE" de la plante : séparée des tissus sains sous-jacents par une barrière de liège et un sclérenchyme épais, elle se dessèche en grande partie. Toutefois, de petits îlots à écorce rouge persistent souvent dans la partie superficielle des tissus. Nous dirons : La souche B permet à la plante d'exclure les tissus atteints par une souche virulente.

C'est ce que nous appellerons l'"Exclusion"

(1) Ce diamètre est choisi à la fois pour éviter la trop grande sensibilité des jeunes tiges et la résistance ontogénique des plus âgées qui dépassent 15 cm. de diamètre.

Les chancres non cicatrisés après 13 mois et qui n'ont pas amené la mort de la branche sont entièrement cicatrisés après 33 mois. Les témoins non surinoculés sont tous morts en 13 mois.

TABLEAU 6

Inoculations consécutives

Cicatrisation des chancres traités et mortalité des tiges

Nombre total de chancres traités/Nombre de chancres cicatrisés/Mortalité

SOUCHES N					
SOUCHES B	1657	1565	1662	935	Inoculés B
	Italie	P.basque	Var	Ardèche	seulement
	(1)(2)(3)	(1)(2)(3)			
	T/ C /M	T /C/ M			
1658 It 3	11/8/0**	7/5/0	x	8/6/2	4/4/0
1566 Pb 2	14/9/1	14/10/3**	14/10/1	8/6/2	4/4/0
1663 Var	3/3/0	10/1/8	6/6/0**	8/5/2	4/4/0
Inoculés N	10/0/10	10/1/9	10/0/10	10/2/8	
seulement					

**= Souches N et B de même origine géographique

(1) T = Total - (2) C = Cicatrisés après 13 mois -

(3) M = branche Morte - x = Combinaison non essayée -

Dans ces essais, nous avons reconstitué un phénomène assez voisin de celui observé en Italie: comme dans ce pays, il y a eu d'abord un développement évolutif de la lésion, puis le cours de la maladie a changé et la guérison est intervenue; de plus, bien que les chancres soient moins développés, les mécanismes anatomiques de cicatrisation sont les mêmes.

Ces expériences de "surinoculation" constituent le procédé de traitement actuellement utilisé en lutte biologique dans l'ensemble de la châtaigneraie; elles sont donc reproduites par les castanéiculteurs à des dizaines de milliers d'exemplaires chaque année.



Figure 23 bis A : Expériences d'exclusion.

A gauche, deux lésions obtenues par inoculation d'une souche virulente N en octobre 1967 puis, "traitées par surinoculation", en juin 1968, d'une souche hypovirulente B, sur tout le pourtour du chancre. Photographiées en avril 1974, elles montrent une cicatrisation totale et la reconstitution de l'écorce détruite, par des bourrelets cicatriciels.

A droite, témoin inoculé mais non "traité", la partie apicale est morte en deux ans, les rejets de la base ont été presque tous tués par le développement du champignon.



Figure 23 bis B : Chancre "traité" dans la châtaigneraie.

Chancre spontané "traité" par une souche B (surinoculé sur tout le pourtour de la lésion) dans une parcelle expérimentale.

Photographié 3 ans après le traitement, ce chancre est entièrement cicatrisé; l'écorce néoformée a repoussé les parties atteintes sous forme d'écailles de rhytidome.

A noter la convergence de forme avec les chancres d'Italie (figure 21, page 70).

Modalités de l'exclusion.

On retrouve la correspondance déjà établie (cf. p.92) entre les souches N et B; les cicatrisations sont plus fréquentes lorsque les souches ont la même origine géographique. On relève ici 90% de cicatrization à 33 mois (28/31) dans une telle éventualité, contre 70% dans le cas contraire(40/56).

Pour la souche N 935, pour laquelle on ne dispose pas de souche d'origine correspondante, on observe même que la fréquence des guérisons est relativement importante puisqu'elle intervient dans 3 cas sur 4.

Le rapprochement des résultats des tableaux 5 et 6 montre que :
En règle générale, les combinaisons favorables à la cicatrization, dans les essais de protection, sont les mêmes que celles qui aboutissent à la guérison dans les inoculations consécutives. Notons cependant quelques différences : les souches B du Pays Basque n'assurent pas la guérison de tous les chancres provoqués par la souche N de cette même origine, alors qu'elles exerçaient une protection totale.

Pour toutes les combinaisons où les souches sont d'origine différente, la fréquence des exclusions est plus élevée qu'attendu. La souche N 935 de l'Ardèche illustre ce cas : protection nulle par la souche 1658 d'Italie et faible par les autres; mais guérison dans 3 cas sur 4. on constate qu'une même souche B peut exercer, mais à des degrés divers, le pouvoir d'exclusion contre plusieurs souches N.

Réisolements et réinoculations.

Par suite de la complexité des faits, nous devons présenter une étude étayée par des résultats expérimentaux nombreux; nous rapporterons donc les résultats concernant d'une part, les chancres expérimentaux des essais de 1966-68, et d'autre part les nombreux chancres traités au cours de l'application de la méthode de lutte biologique. Dans ce dernier cas, la surinoculation est pratiquée sur des chancres plus vieux et plus étendus, aussi les caractéristiques morphologiques sont-elles plus complexes.

Les chancres présentent dans le temps un aspect variable : la partie centrale garde ses caractéristiques morphologiques de chancre évolutif pendant plusieurs mois, voire plusieurs années; par contre, la marge revêt rapidement l'aspect des chancres cicatriciels, puis évolue

vers la cicatrisation complète avec une plus ou moins grande rapidité.

Les réisolements doivent donc être effectués en différents points et à des dates échelonnées.

Une étude dynamique de la répartition topographique des thalles N et B a été effectuée sur un seul chancre (ce travail laborieux n'a pas pu être répété).

De l'ensemble des études (non dynamiques) concernant plusieurs centaines de chancres examinés à l'occasion des contrôles pour la lutte biologique, on peut dégager des lois générales en dépit des résultats complexes :

1/ En bordure de la lésion et dans les couches profondes de la partie centrale, la fréquence de réisolement du type B augmente dès les premiers mois qui suivent le traitement.

2/ Au centre du chancre dans les tissus superficiels, même après cicatrisation apparemment complète, on réisole souvent des types N en mélange avec des B (avec le temps, ces derniers deviennent de plus en plus fréquents). Le remplacement progressif du thalle N par B est rarement total. Il se constitue au sein des tissus cicatriciels des flots de thalle virulent non évolutifs.

3/ Avec le temps, les chances d'isoler N s'amenuisent et, là où existait un thalle N, on réisole B : il y a donc une sorte de "substitution" de la seconde forme à la première.

4/ Si, dans les premières expériences de 66-68, on a toujours pu réisoler la souche B, par contre, dans les châtaigneraies traitées depuis 1974 on aboutit souvent à des échecs apparents, en dépit de la cicatrisation des lésions, même si l'on procède à une excision totale de l'écorce atteinte et que l'on effectue des isolements très nombreux.

Nous avons d'abord cru que ce fait tenait aux difficultés de réisolement de certaines souches B à croissance très lente (souches "sublétales"). L'étude de la virulence des souches réisolées devait

éclairer le problème : dans les premières expériences, les N réisolées étaient virulentes comme celles inoculées, mais dans les essais de lutte biologique en 1979, nous avons établi que certaines des souches N isolées depuis 1974 sont hypovirulentes.

Il s'agit d'un type nouveau : des Hypovirulentes à morphologie N.

Pour illustrer ce fait, nous donnerons un extrait des résultats d'une opération d'évaluation de la virulence de 550 souches, dont 525 N réisolées postérieurement à 1974 à partir de chancres expérimentaux. En 1979, chaque souche a été inoculée (avec 3 répétitions) sur des rejets homogènes de C.sativa à écorce lisse (1). La surface des lésions a été mesurée 7 et 21 semaines après l'inoculation; on a calculé le rapport des surfaces à ces deux dates.

Il est possible de distinguer trois classes de souches :

1/ les hypovirulentes au sens strict : elles se développent lentement dès le début; la surface atteinte à 21 semaines reste inférieure à 15 000 mm², avec un rapport de 4 entre les deux notations; elle peut atteindre 21 000 mm² mais avec un rapport de 3, ou rester inférieure à 12 000 mm² avec un rapport de 4,5.

Dans cette classe, on trouve 21 B (sur 25) et 28 N (sur les 525 testées).

2/ les hypovirulentes de type "américain" : qui se développent d'abord assez vite puis cessent de s'accroître; le rapport des 2 notations est alors inférieur à 4, la surface peut atteindre 50 000 mm². Dans cette classe, on trouve 4 souches B et 7 N.

3/ les virulentes : qui se développent rapidement dès le début sans ralentir leur accroissement. La surface est toujours supérieure à 12 000 mm² à 21 semaines et atteint 108 000 mm² avec des rapports toujours supérieurs à 5, pouvant aller à 30.

Dans cette classe, on trouve toutes les autres souches N (490).

Le tableau 7 donne les résultats pour quelques souches caractéristiques.

(1) Travail effectué en Corrèze, à AUBAZINE et MENOIRE; si l'on se réfère à la figure 23, page 86, on constate que les surfaces atteintes à date équivalente sont très supérieures à celles obtenues à CLERMONT (différence tenant au climat).

TABLEAU 7

Virulence de quelques souches N et B isolées après 1974

Souche	Surface à 21 semaines(1) (en mm ²)	Rapport(2)	Type (3)
He 37C026	203	1	BH
Lz 20C029	3 933	4,4	BH
Pa 02C060	2 066	2,5	BH
He 37C025	533	1	NH
Pa 02C060	3 200	1,9	NH
Lz 20C014	833	3,8	NH
Ga 57C011	6 366	3,0	NA
Ga 57C066	5 633	3,7	NA
Lz 02C030	7 733	2,7	BA
Lz 02C022	6 766	3,9	NA
Lz 02C024	12 300	3,3	BA
Lz 02C002	10 233	5,2	NV
Pa 02C028	19 633	6,8	NV
Lz 20C037	36 133	11,3	NV

(1) Moyenne de 3 répétitions

(2) Rapport = Surface à 21 semaines / Surface à 7 semaines (en mm²)

(3) BH = B Hypovirulente - NH = N Hypovirulente
 NA = N type "Américain" - BA = B type "Américain"
 NV = Normale Virulente

Les deux premiers types sont à l'origine de lésions qui finalement se cicatrisent; il est donc justifié de les qualifier d'hypovirulentes. Le second type est un peu particulier, nous l'avons détecté dans les châtaigneraies traitées depuis 1976 sans y prêter attention spéciale. Lorsque les chercheurs américains nous ont envoyé leurs souches hypovirulentes, la plupart étaient de ce type (d'où la dénomination ci-dessus).

La convergence de l'hypovirulence avec la typologie B fut l'heureuse coïncidence qui a permis d'observer le phénomène, elle n'était que fortuite.

Si les souches B sont bien hypovirulentes, elles n'ont pas l'exclusivité de cette propriété. Ce nouveau phénomène explique les échecs dans les tentatives de réisolement de B. (1)

On peut donc affirmer que, dans tous les cas de cicatrisation, il y a bien substitution partielle et progressive d'une souche hypovirulente dans les tissus de l'hôte. Le terme de "substitution" rend compte des résultats des réisolements mais ne fournit aucune information sur la nature du phénomène. Nous chercherons à préciser ces points par la suite.

Depuis l'apparition de souches hypovirulentes "de type N", nous savons que la virulence des N doit être éprouvée par inoculation; c'est ce qui a été fait en 1979 pour toutes les souches N considérées dans la suite de cet exposé.

En résumé : d'un chancre traité, on réisole :

- des types N dont certains sont virulents et d'autres hypovirulents;
- très souvent, des souches B hypovirulentes.

CONCLUSION ET DISCUSSION SUR L'ACTIVITE PATHOGENE DES 2 TYPES.

=====

Nous avons vu que les souches B se caractérisent par :

- une activité pathogène réduite;
- l'effet de protection;
- l'effet d'exclusion.

Ces faits nous conduisent aux conclusions suivantes :

1 - Les souches B représentent des variants de l'espèce Endothia parasitica dont le pouvoir infectieux est modifié : bien qu'effectuant les premières étapes du cycle infectieux, ils ne peuvent traverser les barrières de défense édifiées par la plante en réaction à l'infection. Cette réduction des capacités infectieuses a été dénommée "hypovirulence".

(1) Nous ferons remarquer que, depuis 1974, nous avons utilisé pour la lutte biologique des souches B "créées" au Laboratoire par le procédé dit "d'anastomose forcée" qui sera étudié plus loin. Il nous est impossible de dire actuellement s'il y a relation entre cette pratique et le nouveau phénomène.

2 - Les types B provoquent des lésions à extension limitée : en profondeur, elles sont restreintes aux assises superficielles du cortex; en surface, sur des organes jeunes, leur développement est arrêté par l'apparition de bourrelets cicatriciels.

3 - Les réisolements montrent que le passage des thalles B sur l'hôte ne restaure ni la morphologie du type Normal, ni son activité pathogène. Les types B sont stables dans leurs caractères morphologiques et dans leurs propriétés pathogènes.

4 - En présence de certaines B, les N n'extériorisent plus la totalité de leur pouvoir infectieux; les lésions se développent comme si la souche B avait été inoculée seule. La présence de B "protège" la plante contre l'effet pathogène de N, bien que le type N puisse être réisolé des lésions cicatricielles ou cicatrisées.

5 - Cet "effet de protection" ne s'exerce pas dans toutes les combinaisons; il existe une correspondance entre les souches N et les B capables de les inhiber. A cette étape de notre étude, elle apparaît essentiellement géographique.

6 - Certaines souches B, surinoculées à des lésions provoquées par des souches N, entraînent la cicatrisation du chancre; le faciès pathologique est similaire à celui des chancres spontanément cicatrisés.

7 - Dans cette "cicatrisation induite", les structures anatomiques et les mécanismes de défense mis en jeu par la plante sont identiques à ceux qui se développent dans les conditions de la cicatrisation spontanée. Le facteur essentiel en est l'édification de barrières de liège réactionnelles efficaces.

8 - Dès lors le parasite est limité, à terme, aux portions externes du cortex et éliminé partiellement avec le rhytidome. Nous avons qualifié le phénomène d'"exclusion" et l'hypovirulence, d'"exclusive".

9 - L'exclusion se produit plus souvent dans le cas où il existe une correspondance entre la souche N et la souche B, selon des modalités analogues à celles qui permettent le phénomène de protection.

10 - Les possibilités de réisolement de la souche N s'amenuisent au fur et à mesure de la cicatrisation au profit de la souche B, puis le rejet du mycélium dans des parties d'écorce desséchées réduit aussi les possibilités de réisoler B.

11 - Dans les chancres devenus cicatriciels à la suite de traitements, et dans ceux du voisinage, on peut isoler des formes à morphologie N mais de virulence atténuée; il existe donc des types N hypo-

virulents, ils ne sont apparus qu'après 1974 (nous n'avons établi leur nature qu'en 1979). Ces nouvelles formes plus adaptées à la survie ont fini par prédominer dans les châtaigneraies.

La corrélation établie au chapitre II (p.82) entre la cicatrisation spontanée et les possibilités d'isoler des types B, n'est pas une simple convergence de deux faits indépendants mais il s'agit bien de deux phénomènes liés par une relation de cause à effet:

Les souches B provoquent la guérison des lésions provoquées par les souches N.

Les expériences de surinoculation permettent de reconstituer des chancres du type "à 2 périodes".

Nous proposons une interprétation pour la guérison spontanée : l'évènement qui sépare les deux périodes d'évolution d'un chancre n'est autre que "l'arrivée" fortuite d'une souche B surinoculée par des vecteurs naturels.

Enfin, on comprend mal comment les souches B, peu adaptées au parasitisme, peuvent "dominer" les populations de types N. Elles doivent donc posséder des propriétés additionnelles.

B - LE CARACTERE TRANSMISSIBLE DE LA MORPHOLOGIE "B"

DESCRIPTION DES CONFRONTATIONS ENTRE THALLE B ET N

=====

Rappelons que, dans la technique de confrontation sur film de cellophane (cf. chap.I), on utilise la photosensibilité du champignon pour effectuer un marquage du thalle. Les auréoles de pycnides apparaissent, chez les souches N, à l'endroit précis atteint par le mycélium au moment où la lumière est appliquée, trois jours après cette application.

On peut observer trois catégories de résultats.

Absence d'interaction entre les thalles.

=====

Cette disposition est illustrée par les figures 24 et 25. Ces exemples diffèrent par les vitesses de croissance relatives des deux souches : en 1, N croît plus rapidement que B ;

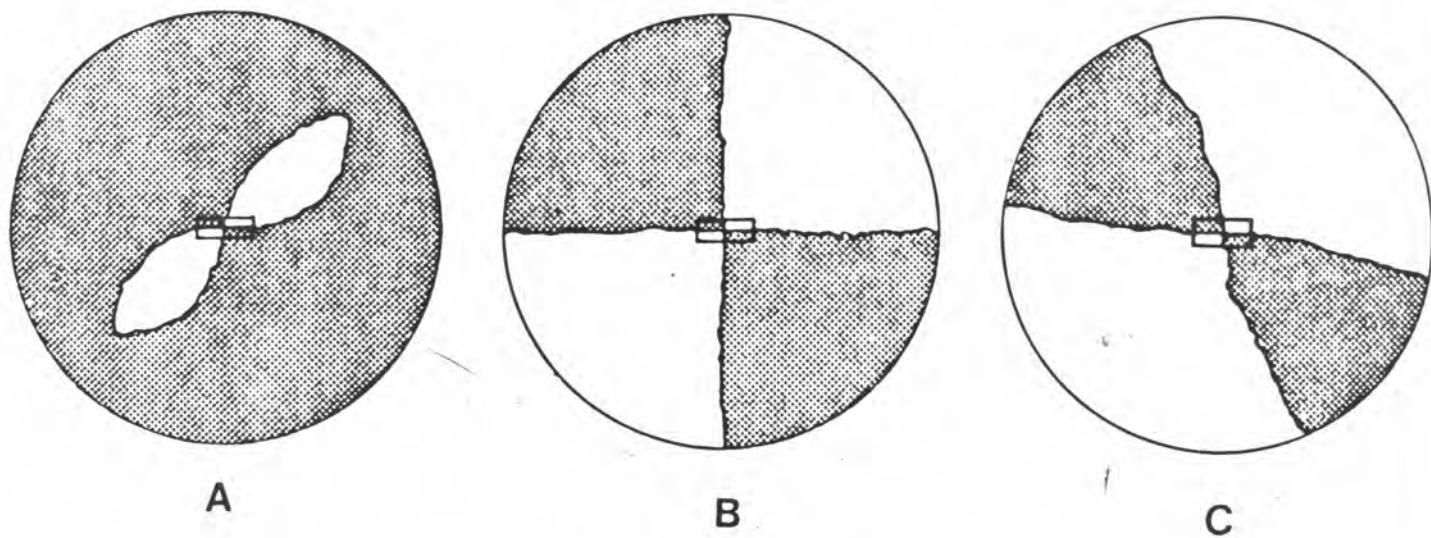


Figure 24 : A - B - C
Confrontations sans interaction

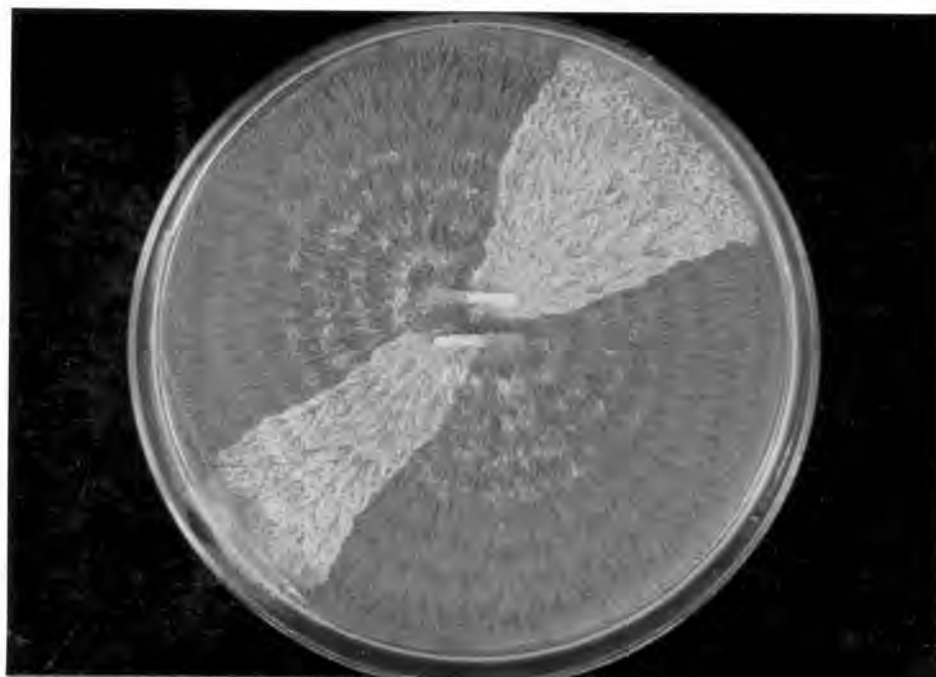


Figure 25
Photographie de confrontations sans interaction

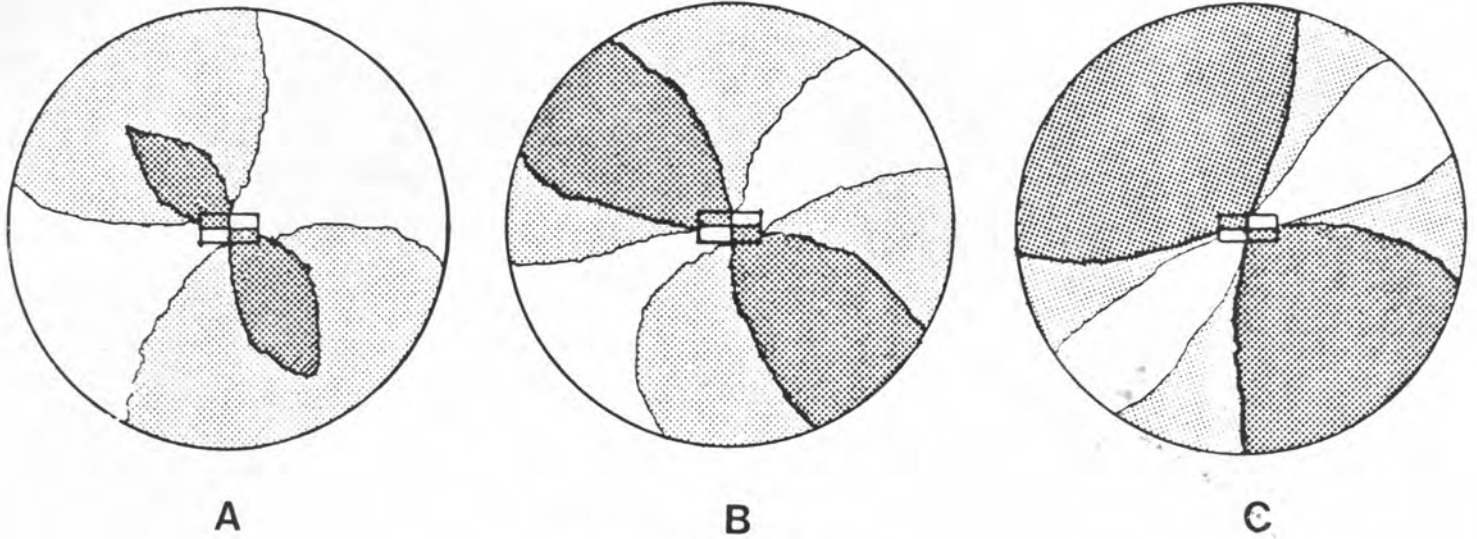


Figure 26 : A - B - C

Confrontations
à interaction régulière

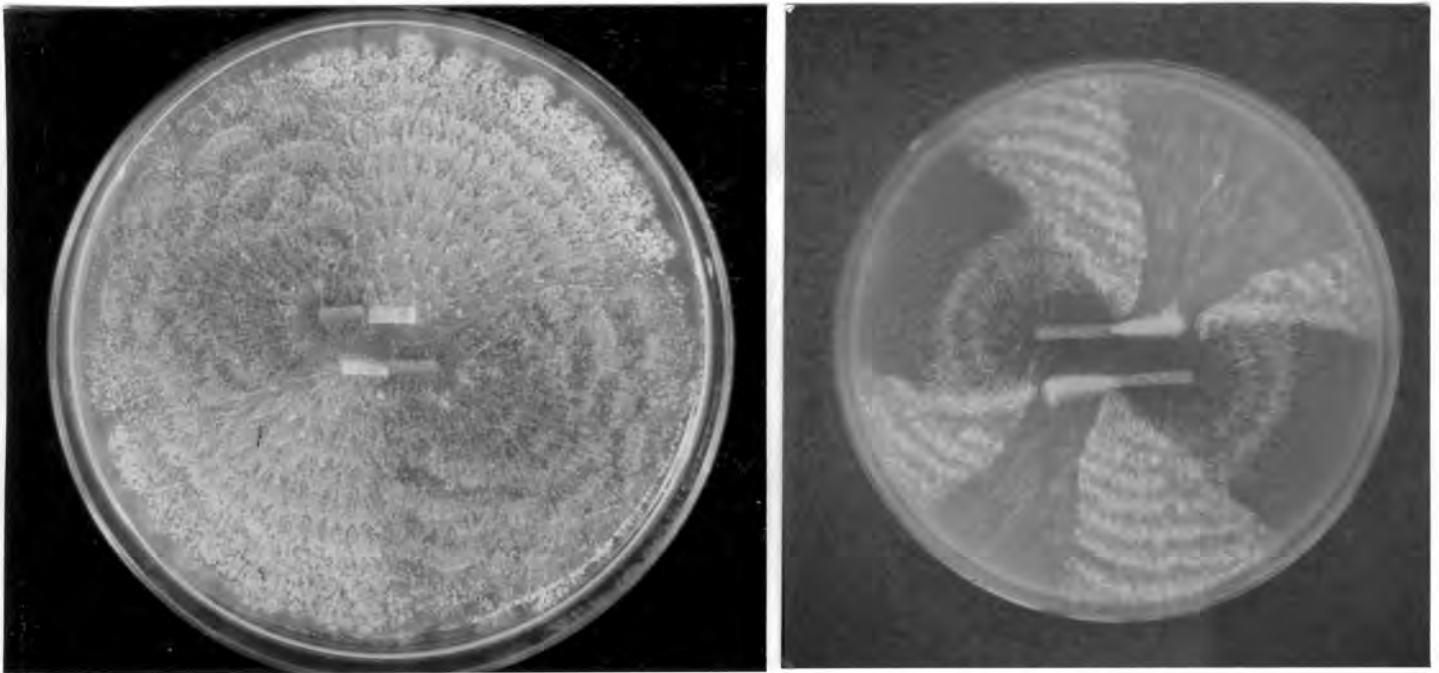


Figure 27. A et B

Photographie de confrontations
avec interaction régulière

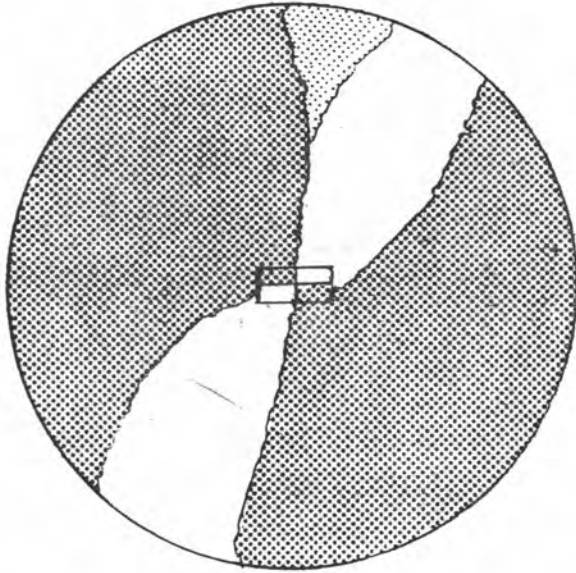


Figure 28 : Interaction irrégulière.
la transformation n'a été obtenue que sur un seul front

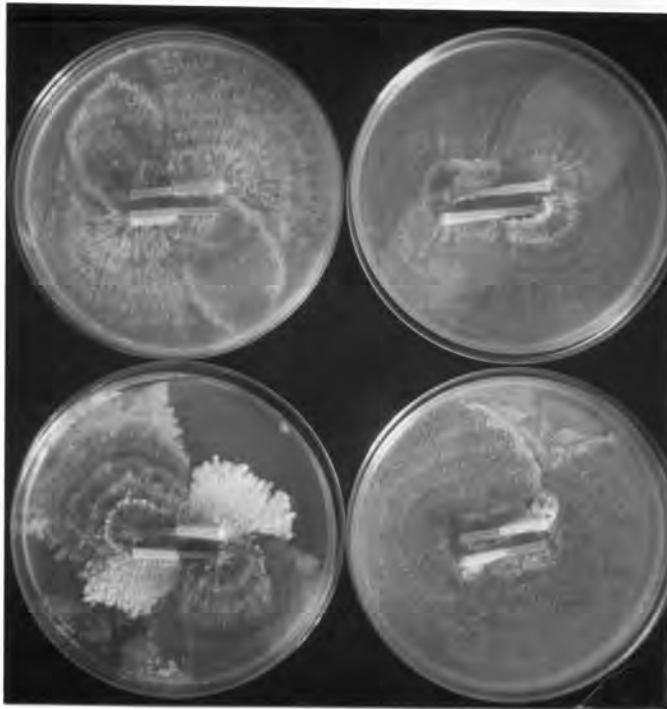


Figure 29 : 4 cas d'interaction : (de gauche à droite et de haut en bas)
interaction régulière (B à croissance rapide) - absence d'interaction -
interaction régulière (B à croissance lente) - interaction irrégulière.

en 3, c'est l'inverse; et en 2, les vitesses sont à peu près égales.

Morphologiquement, on ne constate aucune interaction, comme si les 2 thalles, insensibles à la présence l'un de l'autre, s'étaient bornés à occuper le terrain.

Interaction régulière entre N et B.

=====

Cette disposition est illustrée par les figures 26 et 27.

On y reconnaît 3 secteurs à morphologie distincte :

- 1°) le thalle B, à mycélium incolore et hyphes aériennes formant un duvet blanc, régulier, homogène.
- 2°) le thalle N, avec ses auréoles de pycnides.
- 3°) un "secteur intermédiaire", de morphologie assez variable, avec cependant ces caractères constants : mycélium incolore et absence de pycnides.

Parfois, des hyphes aériennes forment des touffes irrégulières, la densité des filaments est fortement hétérogène. D'autres fois, les filaments croissent parallèlement les uns aux autres et montrent même une zonation sous l'influence de la lumière, tout comme le thalle N. Cette morphologie générale est très voisine de celle de B, nous lui affecterons provisoirement l'indicatif "Bx".

Des variations sont observées au niveau :

- de la courbure des marges de confrontation;
- de l'extension du secteur intermédiaire.

Elles ne peuvent être corrélées avec les rapports de vitesses de croissance.

Interaction aléatoire entre les deux thalles.

=====

Les figures 28 et 29 illustrent ce type de situation.

Parmi 40 boîtes de confrontations entre les deux mêmes souches, une seule boîte montrait le phénomène décrit.

Trois des fronts de contact entre les deux thalles sont du type "sans interaction", alors que sur le quatrième, un secteur intermédiaire est apparu, c'est-à-dire dans 1 front sur 160.

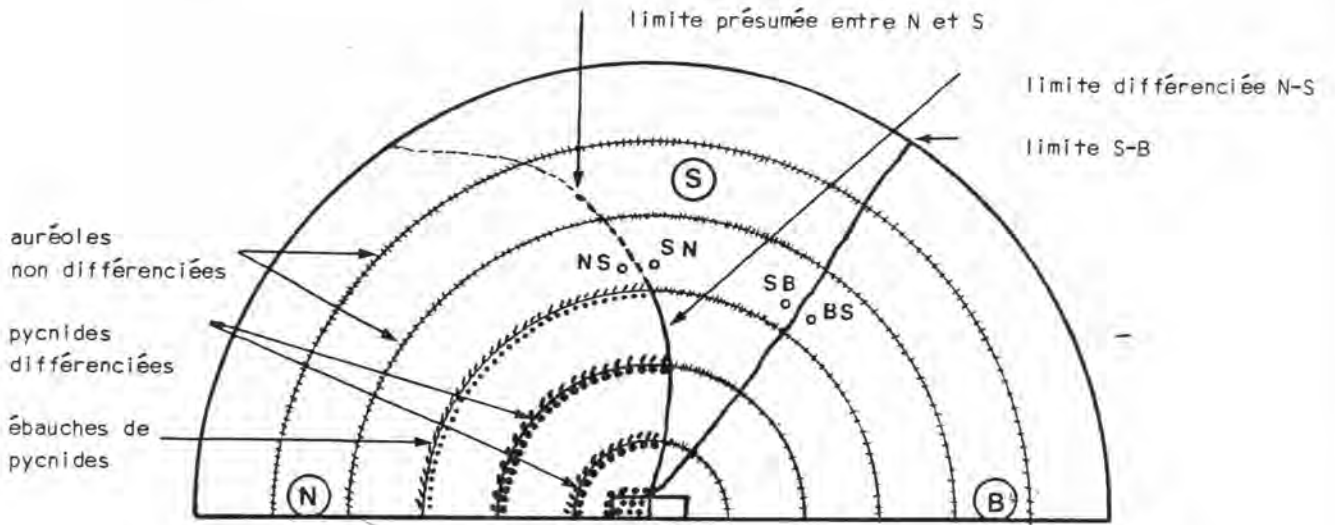


Figure 30.

Lorsqu'on prélève à la marge des thalles, la partie N présente deux zones distinctes : celle âgée de plus de trois jours est pourvue de pycnides bien différenciés (colorés) ; celle de 3 jours, d'ébauches (incolores) ; par contre, le mycélium plus jeune est encore indifférencié et seule une densité plus forte des filaments permet de déceler une zonation. Dans cette partie, il n'est pas possible de savoir si les hyphes appartiennent au thalle N ou au secteur S. D'autre part, il est difficile de transplanter les filaments qui rampent sur la cellophane; nous choisirons de prélever des hyphes aériennes au-delà de l'auréole d'ébauches de pycnides et ce, de part et d'autre de la limite présumée qui sépare les secteurs N et S ainsi qu'illustré ici. Un décalage de deux jours sépare l'âge du thalle au moment du prélèvement et l'index du transplant.

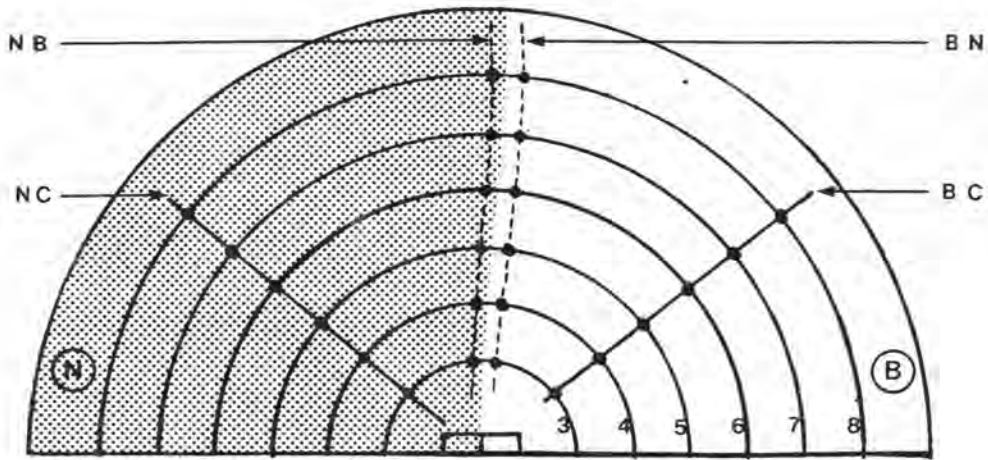


Figure 31 A : Localisations choisies pour les confrontations sans interaction

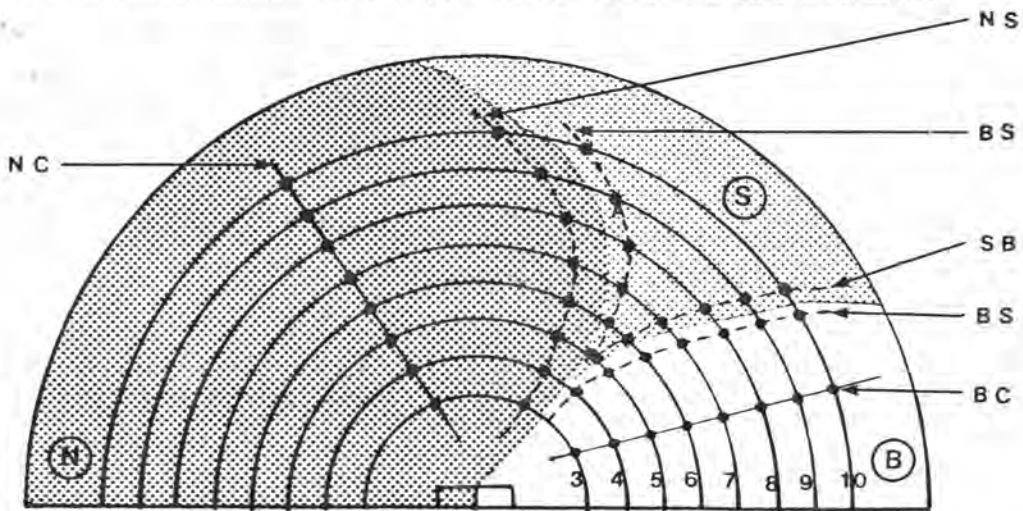


Figure 31 B : Localisations choisies pour les confrontations avec interaction régulière

ETUDE DES CARACTERES CULTURAUX DES DIFFERENTS SECTEURS.
=====

De petits fragments prélevés sous le microscope stéréoscopique sont transplantés sur milieu au malt à 1%. Chaque prélèvement est identifié comme suit :

Une première lettre indique le secteur du thalle prélevé (N = secteur normal; B = secteur B; S = secteur intermédiaire).

Une seconde identifie la situation relative par rapport aux secteurs voisins (C = Centre : point le plus éloigné des autres secteurs au moment du prélèvement); B = à proximité du secteur B; N = à proximité du secteur N; S = à proximité du secteur intermédiaire).

Elles sont suivies par un nombre index qui représente l'âge du thalle au moment où le point de prélèvement a été atteint (correspondant à une auréole de pycnides).

Cas des confrontations sans interaction.
=====

A la marge différenciée des thalles B et N, on effectue chaque jour des prélèvements séparément dans la partie proche du front de contact (1 à 2 mm) et dans la plus éloignée, c'est à dire dans l'axe du secteur (mycélium âgé de quelques heures). Cette disposition est expliquée par la figure 30.

La figure 31 A indique les localisations retenues et le tableau 8, les indexages correspondants et les résultats obtenus.

TABEAU 8 : Prélèvements dans les confrontations sans interaction

Localisation	Index	Cultures obtenues*
N à proximité du front de contact	NB 3 à 8	N
N au point "C" le plus éloigné des fronts	NC 3 à 8	N
B à proximité du front de contact	BN 3 à 8	B
B au point "C" le plus éloigné des fronts	BC 3 à 8	B

* Cultures stables : Les différents repiquages sont identiques aux cultures de départ; certaines, entretenues par transferts de masse depuis 1965 ont conservé leurs caractéristiques culturelles.

Les cultures obtenues présentent une morphologie et une vitesse de croissance semblables à celles des thalles dont elles sont issues; dans ce type de confrontations, aucune modification n'est décelable pour les critères retenus.

Cas des interactions régulières.

=====

Prélèvements à la marge différenciée du thalle.

Les emplacements sont choisis selon la figure 31 B .

TABLEAU 9 : Prélèvement dans les confrontations en interaction régulière

localisation	Index	Type obtenu
N au point "C" le plus éloigné du secteur	NC 3 à 6	N
N au point "C" le plus éloigné du secteur	NC 6 à 10	N
N à proximité du secteur intermédiaire "S"	NS 3 à 10	Bx
Secteur intermédiaire près du front avec N	SN 5 à 10	Bx*
Secteur intermédiaire près du front avec B	SB 5 à 10	Bx*
B près du secteur intermédiaire "S"	BS 3 à 10	B
B au point "C" le plus éloigné	BC 3 à 10	B
* cultures variables au cours des différents repiquages		
NOTE : les résultats varient de N à Bx pour NC4 et parfois NC5		

L'examen du tableau 9 montre que seules les parties centrales du secteur à morphologie N gardent la possibilité de donner des transferts de type N; dès que l'on se rapproche du secteur intermédiaire Bx, les transplants donnent des cultures de type Bx. La modification Bx est donc induite dans le secteur différencié en N, elle s'exteriorise après repiquage. Les autres prélèvements ne montrent aucun phénomène remarquable, ils sont semblables au thalle de départ.

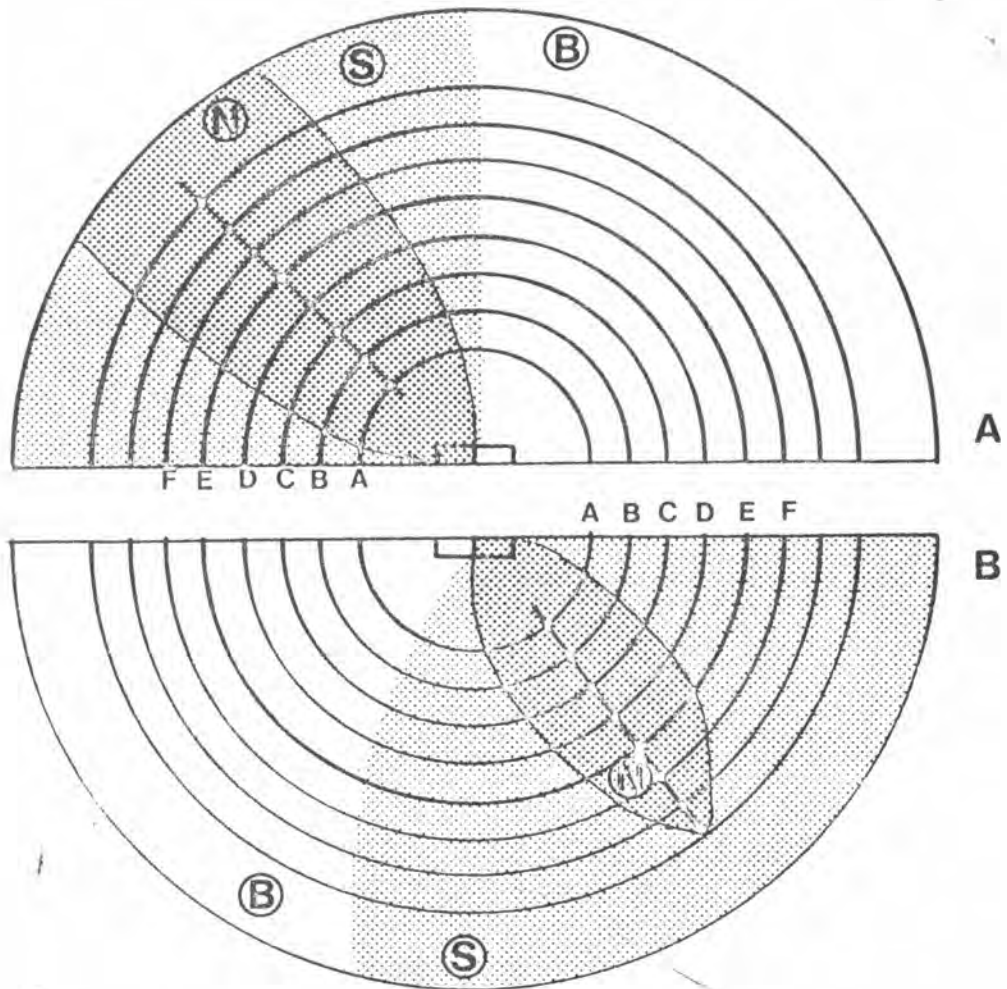


Figure 31 bis

Prélèvements à des distances fixes des Implants

Prélèvements à des distances fixes des implants.

Pour obtenir une vue dynamique du processus, on prélève depuis le 3^e jour jusqu'au 25^e en des localisations précises et on étudie le type cultural obtenu. Certains des transferts proviennent donc de zones où les pycnides sont différenciées (on évite de les effleurer pour ne pas transporter de pycnosporés).

La figure 31 bis indique les localisations choisies pour les prélèvements; elles correspondent aux zones concentriques de croissance différenciées aux jours indiqués, la première (indice A) apparaît au 3^e jour.

Quels que soient l'emplacement et l'âge, tous les prélèvements effectués à partir du secteur B et du secteur intermédiaire Bx donnent invariablement des cultures de type B ou Bx, respectivement.

Il n'en est pas de même de ceux provenant du secteur de morphologie N, où les résultats évoluent avec le temps, conduisant à l'obtention de cultures de type B. Au tableau 10, on exprimera les résultats par le temps nécessaire à la manifestation de ce changement aux points indiqués

TABLEAU 10 : DATE et TEMPS nécessaire à l'apparition du phénomène

Localisation et date de différenciation	Secteur divergent (1) (figure 31 bis A)		Secteur convergent (figure 31 bis B)	
	Date	Temps	Date	Temps
A 3 ^e jour	6 ^e à 7 ^e jour	3 à 4 j.	6 ^e à 7 ^e jour	3 à 4 j.
B 4 ^e j.	7 ^e à 8 ^e "	3 à 4 "	7 ^e à 8 ^e "	3 à 4 "
C 5 ^e j.	9 ^e à 10 ^e "	4 à 5 "	11 ^e à 13 ^e "	6 à 8 "
D 6 ^e j.	13 ^e à 15 ^e "	7 à 9 "	14 ^e à 18 ^e "	8 à 12 "
E 7 ^e j.	16 ^e à 17 ^e "	9 à 10 "	11 ^e à 12 ^e "	5 à 9 "
F 8 ^e j.	20 ^e à 24 ^e "	12 à 16 "	9 ^e à 10 ^e "	1 à 2 "

(1) En réalité, le secteur serait convergent si les dimensions de la boîte de Petri permettait une extension plus grande (cf figure 31bis A).

Il y a un rapport direct entre le temps nécessaire à la modification décrite et la distance du point de prélèvement aux bords du secteur de morphologie N.

Cas des interactions aléatoires.

=====

Les résultats sont conformes à ceux obtenus dans les deux cas précédents : si le front de contact ne montre pas de secteur intermédiaire, chaque thalle conserve son identité morphologique mais dans le cas contraire, les mêmes phénomènes que ceux qui viennent d'être décrits pour les interactions régulières se manifestent.

Variation des cultures issues des secteurs intermédiaires

Contrairement à ce qui avait été observé pour les secteurs N et B typiques, et quelque soit le lieu de prélèvement, les premiers transferts (le à 10e semaine) donnent en général des cultures de morphologie voisine de celle, très diversifiée (type Bx), du secteur lui-même : puis, peu à peu, la morphologie se rapproche de celle de la souche B utilisée dans la confrontation.

Le problème de la modification

A l'intérieur du secteur à morphologie N, des prélèvements homologues effectués à quelques jours d'intervalle, même là où des pycnides sont différenciées, donnent : les premiers, des thalles N et les suivants, des B. Avant de pouvoir affirmer que le thalle N a été modifié par son contact avec B, il faut savoir si des filaments du thalle B ne sont pas venus recouvrir le mycélium N, de telle sorte que l'on aurait prélevé non pas des filaments N, mais des B. Un travail utilisant des noyaux marqués peut apporter une réponse à ce problème. (1)

(1) Noter sur la photographie (figure 27) la grande ressemblance entre le mycélium du secteur intermédiaire et celui du thalle N : même zonation due à l'alternance de lumière mais absence des pycnides.

Etudes à partir de mutants marqués

Par des irradiations U.V. de deux souches isolées d'un même chancre cicatriciel, on a obtenu des mutants. L'utilisation des deux milieux de PUHALLA et ANAGNOSTAKIS permet la sélection des souches en auxotrophes et prototrophes (nous n'avons pas cherché à préciser la nature exacte des déficiences).

Nous avons vérifié au cours d'une série de trois transferts successifs, la stabilité du caractère d'auxotrophie.

Pour la souche B 2028 et son descendant monospore N 2044, nous disposons de mutants auxotrophes et de la souche de départ prototrophe (1).

1°/ dans la confrontation : N prototrophe avec B auxotrophe.

Les repiquages issus du secteur intermédiaire sont prototrophes et le restent au cours des transferts hebdomadaires successifs (six exécutés), tout comme ceux provenant du secteur normal. Ceux du secteur B sont auxotrophes.

2°/ dans la confrontation : N auxotrophe avec B prototrophe.

Les résultats sont homologues, le secteur intermédiaire et le secteur N fournissent des thalles auxotrophes (6 transferts); le secteur B reste prototrophe. Le secteur intermédiaire est donc constitué par les hyphes du thalle N.

Nous en concluons que :

- a/ il n'y a pas recouvrement du thalle N par les filaments B.
- b/ le thalle N subit une modification qui s'exteriorise immédiatement par l'apparition du secteur intermédiaire. La morphologie Bx est très voisine de B; du point de vue typologique nous la considérons comme équivalente.

(1) souche B 2028 isolée d'un chancre cicatriciel de la commune des MAYONS (inoculation N 1663 et B 1662); l'irradiation a porté sur des semis monospores des 2 souches 2028 et 2044.

c/ cette modification s'étend ensuite au mycelium différencié chez lequel elle ne s'extériorisera qu'après repiquage.

d/ les caractères d'auxotrophie ne se transmettent pas d'un thalle à l'autre.

La présence de B induit donc dans le thalle N une modification qui le "transforme" de façon stable et durable et lui fait adopter la morphologie B.

C - CONDITIONS DE L'INTERACTION

NECESSITE DU CONTACT PHYSIQUE DES THALLES.

=====

Eloignement des implants

=====

En faisant varier la distance entre les implants N et B, on constate que le secteur intermédiaire n'apparaît pas avant le contact des thalles. Des pycnides se différencient sur les zones concentriques formées postérieurement au contact parce que leur initiation avait été induite auparavant. Après le contact, cette induction n'a plus lieu.

Les faits sont illustrés par la figure 32 et les documents photographiques correspondants :

en a) : le contact entre les thalles s'est produit au 4e jour, le secteur est apparu au 6e jour.

en b) : contact au 5e jour, secteur au 7e; etc...

Barrières mécaniques

=====

Pour retarder le contact entre les thalles, après avoir effectué une entaille dans le film de cellophane, on enfonce une mince lame de verre à l'intérieur du milieu gélosé. Le secteur intermédiaire n'apparaîtra qu'au-delà de la barrière mécanique, comme le montre la figure 33.

Si l'on sépare les thalles par un pli du film de cellophane, le secteur intermédiaire n'apparaît pas non plus, bien que dans ces conditions des métabolites puissent diffuser.

Enfin, si, deux fois par jour, on incise les filaments du front des thalles, l'apparition du secteur intermédiaire est très généralement empêchée ou différée, mais l'imprécision de ce procédé conduit à des résultats irréguliers.

Il ressort de ces trois types d'expériences que le contact physique des deux thalles est nécessaire pour qu'intervienne la transformation du thalle N.

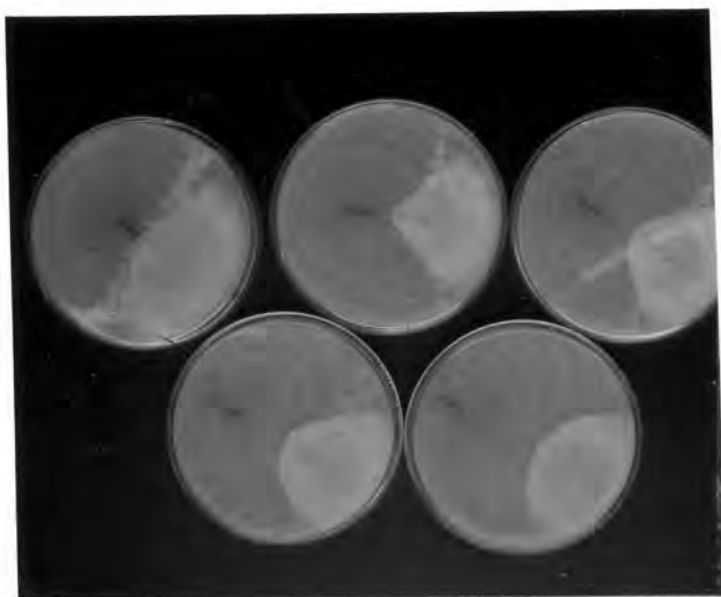


Figure 32

de gauche à droite et de haut en bas
en : a - b - c - d - e -
La distance entre les implants augmente,
la transformation n'a lieu qu'après contact des thalles

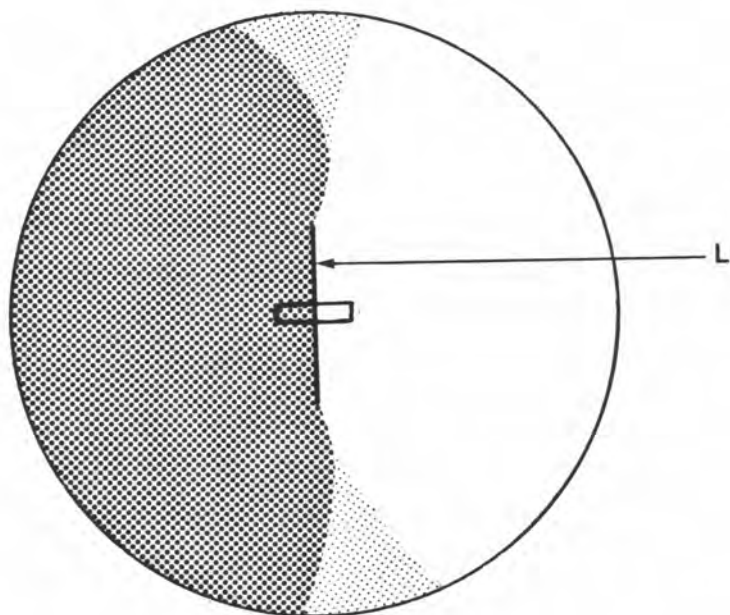


Figure 33

Barrière mécanique

Entre les thalles N et B une lame de verre L a été insérée.
La transformation n'a lieu qu'après dépassement de la barrière
ainsi créée.

LA "COMPATIBILITE" DES SOUCHES

=====

Le tableau 11 récapitule les résultats des confrontations d'un grand nombre de souches N avec des souches B.

La réaction est notée "positive" s'il apparaît un secteur intermédiaire de façon régulière, c'est-à-dire sur tous les fronts de contact; c'est ce que nous avons dénommé "interaction régulière".

Elle est notée "f" si la transformation se produit sur quelques fronts seulement (interaction aléatoire), et négative dans le cas où aucune transformation n'est observée (cas des confrontations sans interaction).

Ces résultats montrent une grande complexité :

une souche B n'entre en interaction positive qu'avec certaines souches N.

Dans une première analyse, nous dirons que les souches N qui permettent un tel résultat sont "compatibles" avec la souche B testée, nous réservant de préciser plus loin cette notion.

Conclusion et discussion sur la transmission de la morphologie B

=====

Les résultats acquis grâce aux diverses expériences de confrontation de thalles N et B, nous conduisent aux conclusions suivantes :

- La morphologie B des variants d'Endothia parasitica hypovirulents associés à la cicatrisation spontanée des chancres, est un caractère transmissible d'un thalle B à un thalle N.

- Cette transmission nécessite le contact physique des filaments des deux partenaires.

- La transformation du thalle est définitive à travers les transferts de masse qui reproduisent le thalle identique à lui-même avec sa nouvelle morphologie.

- La transformation n'a pas lieu dans toutes les confrontations: toute souche B se montre capable de provoquer la transformation de certaines souches N, mais pas de toutes. D'autre part, toute souche N peut être transformée en B, à condition qu'il soit possible de trouver la souche B "compatible" (la généralisation de cette conclusion sera exposée au chapitre de l'application pratique).

TABLEAU 11

Tableau des compatibilités entre N (lignes) ET B (colonnes) de différentes origines

Origine souche B	Ardeche	Var 1	Var 2	Var 3	Var4	Correze	P;Basque	Cor.	Italie									
Souches N	2100	2101	2028	2141	2063	2067	2086	2074	2079	2025	2091	2116	1889	2104	2125	1899	2029	2032
Ardèche 935	+	-	-	+	-	-	f	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2109	f	-	-	-	-	-	-	-	-	f	+	-	-	-	-	-	-	-
2110	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	f
2111	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	f	-
VAR 1 1662	-	-	+	-	-	f	-	+	-	-	f	-	-	-	-	-	+	+
2080	f	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
VAR 2 1955	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
1992	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1993	f	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2026	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	f	+	+
2064	-	-	+	+	-	+	f	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
VAR 3 2023	f	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
2072	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
VAR 4 2024		-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
CORREZE 2090	-	-	-	-	f	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2112	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2115	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	f	+	-	-	-	-	-	-
P.Basque 2102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
1566	f	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Corse 2092	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Italie 1657	f	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1896	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
2031	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

ETUDE DES ANASTOMOSES ENTRE THALLES N ET B.
=====

Le contact des thalles donne lieu à des anastomoses végétatives.

La technique de culture sous lamelle va nous permettre de suivre sous le microscope les étapes de ce processus.

L'utilisation du contraste de phase et du contraste interférentiel nous aident à déceler d'éventuelles altérations du cytoplasme ou des parois de l'article mixte.

Dans nos conditions expérimentales, 24 à 48 heures suffisent à obtenir le contact des thalles. Les anastomoses se produisent dès le 2e jour suivant, soit entre rameaux téléomorphiques soit entre hyphe grêle à croissance bloquée et rameau téléomorphique.

Devenir des anastomoses.
=====

On distinguera deux cas :

Les anastomoses "compatibles".

Elles sont caractérisées par des articles mixtes où le protoplasme apparaît homogène, peu vacuolisé; les parois restent réfringentes, les septa minces et peu réfringents. Cette situation se maintient pendant plus de 48 heures, après quoi les articles mixtes évoluent comme des hyphes ordinaires; certaines portions émettent des ramifications, d'autres dégènèrent (figure 34, page 118 bis).

Les anastomoses "incompatibles".

La dégénérescence progressive des articles mixtes et des articles contigus se matérialise par 2 types de modifications concernant l'une le protoplasme, l'autre les parois.

Bien que le déroulement de ces événements soit un phénomène continu, nous reconnaitrons plusieurs étapes aux caractéristiques suivantes :

Stade 1 : quelques granulations fortement réfringentes apparaissent dans le cytoplasme de l'article mixte.

Stade 2 : le phénomène de granulation se généralise et atteint les articles mitoyens.

Stade 3 : dans l'article mixte, les granules se rassemblent en masses grossières (aux contours mal définis); ses parois présentent un début d'hydrolyse. A quelque distance, la réfringence des cloisons s'accroît : la zone d'anastomose semble être isolée du reste du thalle.

Stade 4 : l'hydrolyse des parois et des cloisons de l'article mixte se poursuivent; le contenu cytoplasmique des articles mitoyens constitue des amas granuleux irréguliers; l'ensemble se regroupe.

Stade 5 : l'hydrolyse des parois de l'article mixte s'achève, les résidus cytoplasmiques sont libérés dans le milieu (figure 35, page 118 bis).

Une vue dynamique des phénomènes nécessiterait des observations de l'état des différentes anastomoses à des intervalles de temps rapprochés. Malheureusement, l'observation prolongée sous un éclairage intense peut provoquer la dégénérescence ou l'accélérer.

On peut cependant dresser un premier bilan quand les contacts ont vingt-quatre heures (72 heures après l'ensemencement), et un second quand les anastomoses ont environ 96 heures.

Le tableau 12 récapitule les résultats des observations effectuées sur 3 confrontations de la souche B2141 avec les souches N2023, 2110 et 2026. Pour chacune, 4 lames ont été observées (observations effectuées par G.BALLARD -août 1979-).



FIGURE 34
Microphotographie d'anastomoses compatibles.
Le mélange des cytoplasmes n'a pas produit
de dégénérescence.
(photographie S. BERTHELAY-SAURET).

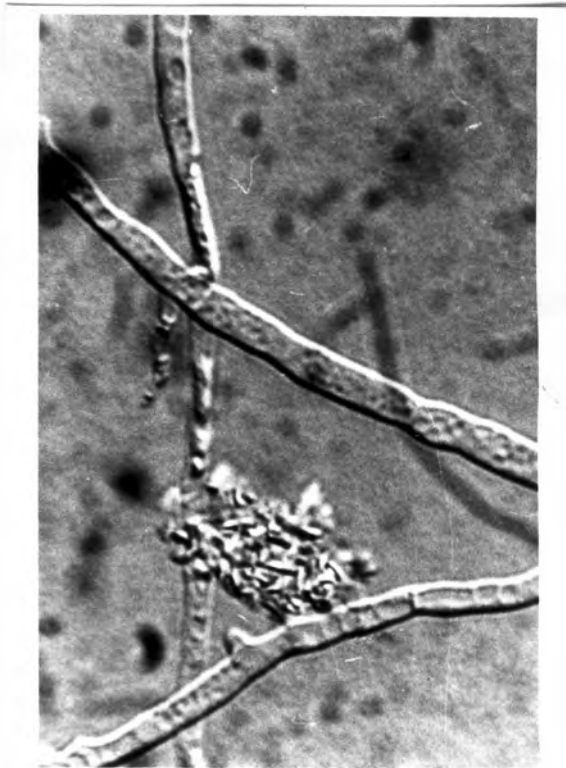


FIGURE 35
Microphotographie d'anastomoses incompatibles
Le mélange des cytoplasmes a produit la
dégénérescence des hyphes et la rupture de la
paroi. (photo S. BERTHELAY-SAURET).

TABLEAU 12 : Confrontations de la souche B 2141

Souche N et Temps	Stade d'évolution des anastomoses							Nombre d'anastomoses observées
	0*	1	2	3	4	5		
2023	24h 1)	9	1	1	0	0	0	11
	2)	4	0	0	0	0	0	4
	3)	3	0	0	0	0	0	3
	4)	4	0	0	0	0	0	4
	Total	20	1	1	0	0	0	22
	96h 1)	8	3	0	2	0	0	13
	2)	5	1	1	0	0	0	7
	3)	5	1	0	0	0	0	6
	4)	5	3	1	0	0	0	9
	Total	23	8	2	2	0	0	35
2110**	24h 1)	1	0	0	0	0	0	1
	2)	2	2	1	1	0	0	6
	3)	4	3	2	2	2	1	14
	Total	7	5	3	3	2	1	21
	96h 1)	0	0	0	0	0	1	1
	2)	0	0	0	0	4	2	6
	3)	0	1	3	4	2	4	14
	Total	0	1	3	4	6	7	21
2026	24h 1)	3	2	0	5	1	0	11
	2)	2	1	2	2	0	0	7
	3)	3	2	1	2	0	0	8
	4)	8	4	0	1	1	0	14
	Total	16	9	3	10	2	0	40
	96h 1)	2	1	1	5	2	0	11
	2)	2	1	2	0	2	0	7
	3)	2	2	0	2	2	0	8
	4)	6	2	4	1	1	0	14
	Total	12	6	7	8	7	0	40

* le stade 0 correspond à l'absence de tout symptôme de dégénérescence

** 4è lame : inutilisable

On remarquera :

souche N 2023 :

aucune anastomose ne dégénère au-delà du stade 3, la majorité (70%) reste au stade 0. Entre 24 et 96h, le nombre d'anastomoses augmente. Ce type de confrontation montre donc une dégénérescence rare, lente et peu profonde.

souche N 2110 :

aucune anastomose n'est indemne. Elles atteignent ou dépassent toutes rapidement le stade 3; 33% sont au stade 5 en fin d'expérience. Ici apparaît une dégénérescence fréquente, rapide et profonde.

souche N 2026 :

1/ A la 24e heure : 40% des anastomoses sont normales, mais 30% ont atteint ou dépassé le stade 3;

2/ à la 96e heure : la situation n'est guère modifiée. Si près de 50% des anastomoses ont dégénéré légèrement et précocement, 25% restent viables. La dégénérescence est fréquente et rapide mais peu profonde.

Ces observations sont transposables. Il doit être possible, grâce à un examen microscopique 96 heures après la mise en présence des thalles, d'apprécier le degré de compatibilité des souches. Il suffirait pour cela de se borner à l'examen des classes extrêmes (stade 0 et 5).

Nous avons voulu vérifier cette hypothèse sur une série de confrontations entre les souches B 2100, 2028, 2141, 2063, 2067, 2086, 2074, 2025, 2104, 2125, 1899 et 2029, (provenant de régions géographiques assez diversifiées), et la souche N originaire de la même aire et nous avons prévu d'exécuter toutes les combinaisons possibles (soit 144 confrontations correspondant à 576 lames et à 5760 examens microscopiques); ce travail n'est pas achevé.

Le tableau 13 récapitule les premières observations. Chaque résultat est exprimé par un rapport qui donne, pour 10 anastomoses, les fréquences moyennes du stade 0 et du stade 5. On y a ajouté les

résultats du tableau 11 qui donnait la compatibilité pour la transmission de l'hypovirulence des mêmes souches.

En dehors de 3 cas aberrants (2102 avec 2025 et 2074, ainsi que 2026 avec 2074), les 97 cas étudiés montrent que les anastomoses non dégénérantes conduisent à la compatibilité. Dans les confrontations incompatibles, les anastomoses viables sont rares à inexistantes (sauf les 3 cas cités pour lesquels aucune explication n'a été trouvée); les cas de compatibilité aléatoire (2109 avec 2025, 1662 avec 2067 et 2026 avec 1899) nécessiteraient une étude plus précise (comme celle de G.BALLARD).

Les résultats montrent aussi que l'origine géographique des souches ne suffit pas à rendre compte du phénomène de compatibilité.

Ainsi, pour les 2 souches B du Var (isolées toutes deux de la commune des MAYONS) l'une: 2028 est compatible avec la N 1662 et l'autre l'est avec N 2080, toutes deux isolées de la même commune. Il existe donc, en cette localité, 2 souches N qui possèdent chacune leur souche compatible propre. La compatibilité est un caractère propre à chaque souche, la répartition géographique s'est d'ailleurs notablement compliquée depuis le début des études.(V.chap.:lutte biologique.)

A la lumière de ces travaux, la compatibilité pour la transmission de l'hypovirulence entre B et N apparaît bien contrôlée par la viabilité des anastomoses végétatives; il y a une corrélation inverse entre sa fréquence et celle de la dégénérescence précoce des articles mixtes.

Tableau 13

Rapport : anastomoses viables/dégénérées et compatibilité de transmission

	a	b	c	d	e	SOUCHE B _g						h	i	k	l
Souche	Ard.	Var 1		Var 2		Var 3	Var 4	P.b.	Corse	Italie					
N	2100	2028	2141	2063	2067	2086	2074	2025	2104	2125	1899	2029			
2109	3/0	0/8	1/6	0/7	0/9	2/5	0/8	2/3	0/9	0/10	0/10	0/7			
Ard.	+	-	-	-	-	-	-	f	-	-	-	-			
2110	8/0	X	0/8	X	0/9	6/1	0/7	0/10	0/10	X	X	1/5			
Ard.	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-			
2102	0/8	X	0/10	X	0/7	0/7	5/2	8/0	8/0	X	X	0/10			
P.Ba.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-			
2080	1/8	0/10	8/0	0/10	0/10	7/0	0/10	9/0	0/8	0/10	7/0	0/10			
Var	f	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-			
1662	0/9	8/0	0/6	0/10	4/4	X	8/0	0/7	X	X	0/10	7/0			
Var	-	+	-	-	f	-	+	-	-	-	-	+			
2026	X	9/0	X	X	8/1	0/8	0/8	0/6	0/8	X	X	9/0			
Var	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	f	+			
2072	X	X	6/1	X	8/0	X	X	0/8	X	X	8/1	0			
Var	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+			
2024	0/8	0/10	0/9	0/10	0/10	9/0	0/10	8/2	0/10	0/8	7/1	0/7			
Var	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-			
2092	0/10	0/10	7/0	X	0/9	6/0	X	7/0	0/6	0/10	8/0	0/10			
Corse	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-			
2031	7/1	X	8/0	X	9/1	X	X	0/10	0/9	X	6/1	8/0			
Ital.	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+			
1896	0/10	X	7/0	0/10	0/9	7/1	X	X	X	X	8/0	0/9			
Ital.	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-			

Conclusion sur le phénomène d'anastomose.

=====

Si toutes les souches se montrent capables de contracter anastomose avec une souche quelconque, la mise en commun des cytoplasmes n'est pas toujours suivie d'une poursuite harmonieuse des processus vitaux.

L'anastomose viable apparaît être l'évènement indispensable à la transformation; elle conditionne le transfert des "déterminants" de la "morphologie B" au thalle N.

CONCLUSIONS

L'étude comparée des propriétés pathogènes des souches N et B introduit la notion d'hypovirulence : perte d'une partie des propriétés pathogéniques du champignon qui ne lui permet plus de déborder les défenses naturelles de la plante. Cette particularité s'est trouvée, au début des travaux, curieusement et heureusement associée à des caractères morphologiques: type morphologique "B" (incapable de produire son pigment et ses fructifications asexuées dans les conditions standard de culture).

La seconde partie du chapitre III nous a montré que l'hypovirulence était transmissible in-vitro d'un thalle B à un N et nous avons montré que l'anastomose des hyphes était le moteur de cette transformation. Dès lors on comprend pourquoi on réisole la forme B après avoir surinoculé les chancres provoqués par N : Il y a eu transmission de l'hypovirulence in-vivo. Le thalle virulent installé dans les tissus a été transformé en hypovirulent; d'où la perte de son pouvoir pathogène et la récupération par la plante de l'efficacité de ses défenses.

La présence de souches hypovirulentes dans les chancres spontanément guéris ne peut plus passer pour une simple convergence, on est contraint d'accepter l'idée d'une relation de cause à effet entre la présence de B et la cicatrisation.

Tout se passe donc comme si l'hypovirulence était une maladie du parasite. Les propriétés additionnelles que nous cherchions pour expliquer la prédominance des formes B dans la châtaigneraie tiennent à ce caractère contagieux.

Cette transformation n'a lieu que si les deux partenaires possèdent une "compatibilité" corrélative à la survie du mélange des deux protoplasmes.

Ainsi se trouve justifié le fait que la guérison d'une lésion ne peut être obtenue, à coup sûr, par la surinoculation de n'importe quelle souche B.

Une autre notion apparaît : la compatibilité d'anastomose n'est pas un phénomène de "tout ou rien", mais connaît des degrés. La compatibilité partielle, génératrice des confrontations où l'on observe une interaction aléatoire, correspond in vivo à une guérison aléatoire des chancres.

Les 3 caractères corrélatifs:

- cicatrisation provoquée (ou pouvoir d'exclusion)

- interaction in vitro entre souches N et B

- compatibilité d'anastomose

peuvent donc être classés de la façon suivante (en 3 classes) :

- | | | |
|------|--|-----------------------------|
| 1/ | <u>COMPATIBILITE d'anastomose régulière</u>
(ou totale) | <u>équivalente à:</u> |
| | INTERACTION | <u>Régulière</u> |
| et : | CICATRISATION provoquée | <u>Hautement Probable</u> |
| 2/ | <u>INCOMPATIBILITE d'anastomose totale</u> | <u>équivalente à:</u> |
| | INTERACTION | <u>Absente</u> |
| et : | CICATRISATION provoquée | <u>Hautement Improbable</u> |
| 3/ | <u>INCOMPATIBILITE /COMPATIBILITE partielle</u> | <u>équivalente à:</u> |
| | INTERACTION | <u>Aléatoire</u> |
| et : | CICATRISATION provoquée | <u>Aléatoire</u> |

Dans les châtaignerales, la surinoculation d'une souche B incompatible avec celle qui a provoqué le chancre aboutit souvent à la cicatrisation avec transformation du thalle N en dépit du comportement des deux souches in vitro. Les chances de réussite sont encore plus élevées quand on est en présence de deux souches dont la compatibilité d'anastomose est partielle.

Le contrôle de la transformation N en B joue un rôle important puisque les chances de réussite sont réduites, mais elles ne sont pas nulles et ce point revêt une importance extrême en lutte biologique.

L'incompatibilité d'anastomose est donc, en réalité, une compatibilité partielle à fréquence très basse (au point d'être indécidable dans les expériences courantes de laboratoire où le nombre de confrontations est limité).

Cette interprétation peut-elle être généralisée? En d'autres termes, est-il possible, en multipliant considérablement le nombre de confrontations entre thalles, d'obtenir la transformation de toute souche N par des souches B considérées comme incompatibles?

Nous verrons que la pratique de la lutte biologique apportera une réponse positive et ouvrira les voies pour la création de nouvelles souches hypovirulentes.

Lors de la réalisation des anastomoses, on peut penser qu'il y a transfert d'information de B vers N; au minimum, cette information concerne la morphologie de "N". Il est important de connaître si les thalles N, morphologiquement modifiés en "B", sont devenus hypovirulents et si ce caractère est contagieux comme pour les "B" d'origine.

Dans le cas des expériences de surinoculation de chancres évolutifs par une souche B, on réisole certes un thalle B là où existait un "N", mais aucune preuve ne permet de préciser si c'est la souche B introduite ou le thalle N d'origine modifié en "B".

Dans les expériences in vitro, on sait que le secteur modifié appartient bien au thalle N, mais dans l'état actuel de l'exposé, ses propriétés pathogéniques n'ont pas encore été étudiées.

La dernière partie du chapitre IV apportera des éléments de réponse à ce problème.

Le déterminisme de l'hypovirulence n'en reste pas moins obscur et certaines modalités de sa transmission encore inexplicées.

La transmissibilité de l'hypovirulence nous apparaît comme la "propriété additionnelle" capable d'expliquer pourquoi une forme peu adaptée à la survie dans les conditions naturelles, peut néanmoins se répandre dans toute la châtaigneraie et éliminer apparemment les formes virulentes bien adaptées.

En réalité, l'hypovirulence étant une maladie contagieuse du parasite, ce ne sont pas les souches hypovirulentes qui se maintiennent et se disséminent mais c'est l'hypovirulence qu'elles véhiculent et communiquent aux souches saines qui s'étend de proche en proche. Ces notions seront précisées au chapitre sur l'épidémiologie.

Enfin, le passage d'information entre les deux thalles soulève bien des problèmes : quelle en est la nature, quel en est le support, quelles en sont les modalités, la nature de l'hypovirulence diffère-t-elle d'une souche à une autre?

Du point de vue pratique agronomique, un pas a été franchi puisque la surinoculation de chancres avec une souche hypovirulente a donné lieu à la même séquence d'évènements que celle observée en Italie :

- mêmes structures anatomiques de résistance.
- même résultat final : la guérison des lésions.

Des applications pratiques peuvent être envisagées.

Il est cependant utile de posséder quelque données biologiques supplémentaires avant de pouvoir essayer cette transposition sur le plan agronomique; en particulier il serait bon de mieux connaître les modalités du phénomène de compatibilité végétative puisqu'il conditionne dans une certaine mesure la réussite des expériences d'exclusion.

CHAPITRE IV

APPROCHE DU DETERMINISME DE L'HYPOVIRULENCE

A - SEGREGATION VEGETATIVE A PARTIR DE SPORES UNINUCLEEES

PREMIERE GENERATION

Descendance végétative des souches N sauvages.

Descendance végétative des souches B sauvages.

Description de la forme JR.

Stabilité des cultures obtenues

GENERATIONS ULTERIEURES

Descendance des types N (sauvages et issues de B)

Descendance végétative des types JR

Descendance des souches B monospores de première génération.

Discussion et conclusions

B - CONFRONTATION DU TYPE JR AVEC LE TYPE N.

C - ETUDE DES PROPRIETES DES DIVERSES SOUCHES.

SOUCHES CONCERNEES - RESULTATS

Virulence

Souches N - Souches B et JR

Pouvoir d'exclusion et Transmissibilité

Pour la compatibilité - Pour le pouvoir d'exclusion

Discussion et conclusions

Relations avec la compatibilité selon S.ANAGNOSTAKIS

CONCLUSIONS

APPROCHE DU DETERMINISME DE L'HYPOVIRULENCE

A - SEGREGATION VEGETATIVE A PARTIR DE SPORES UNINUCLEEES

La forme sexuée étant rare en France et les procédés pour l'obtention de périthèces étant inconnus en 1965, une étude des descendances asexuées a été entreprise à partir de diverses souches N et B. Rappelons que les pycnospores sont uninucléées.

PREMIERE GENERATION
=====

Descendance végétative des souches N sauvages.
=====

Une première génération de 100 semis monospores est effectuée à partir des spores produites en boîtes de Petri après 7 jours de culture. De 1965 à 1980, plusieurs dizaines ^{de souches} de souches N, isolées de chancres de diverses catégories et dans maintes situations géographiques, ont été soumises à ce test.

La totalité des cultures obtenues sont du type N. On a étudié sur ces cultures d'origine monospore :

- 1/ le type morphologique : il manifeste sa stabilité à travers plusieurs générations de transferts de masse.
- 2/ le pouvoir pathogène sur l'arbre : il reste égal à celui de la souche d'origine.

On peut donc conclure que les souches N sauvages ne montrent pas de ségrégation végétative au cours de la première génération monospore.

Descendance végétative des souches B sauvages.
=====

Elle est obtenue à partir des pycnides formées sur des boîtes de Petri soumises à un fort éclaircissement (5000 lux) pendant 15 à 60 jours selon les cas (certaines souches B ne fructifient que très tardivement).

Les cultures obtenues montrent une disjonction en 3 types :

- 1/ le type Normal N, formant des pycnides dans les conditions standard.
- 2/ le type B, semblable à la souche de départ avec toutes ses particularités.
- 3/ Un type nouveau que nous avons désigné "JR".

Description de la forme JR. (figure 36 A et B)
=====

Le mycélium est d'abord hyalin, à articles cylindriques; au 3ème jour ^{apparaissent} des articles ^{short} courts et ^{swollen} renflés, à parois ^{strange} fortement réfringentes, dont le protoplasme se remplit de granules jaune orange; souvent, des vésicules latérales apparaissent; leur cytoplasme contient également des granules jaunes. Ces articles courts deviennent rapidement plus nombreux et constituent des amas d'éléments isodiamétriques. Dès le 8e jour, des spores se forment à leur surface par bourgeonnement. Elles sont identiques à celles différenciées dans les pycnides des types N.

Les thalles JR croissent ^{slow} lentement (50 à 60% de la souche B); les bords du thalle sont très irréguliers, surtout lors des premiers ^{edge} transferts de masse. Le mycélium aérien est rare ou absent, mais la sporulation est abondante.

Le type JR est remarquable parce qu'il n'a jamais été obtenu à partir de chancres, au cours d'une dizaine de milliers d'isolements effectués aussi bien à la Station de l'I.N.R.A. qu'au Laboratoire de Lutte Biologique. Il semble donc qu'il s'agisse d'une pure création de laboratoire. La figure 36 A et B illustre ces descriptions.

Nous avons évalué la répartition des fréquences d'obtention de chacun des 3 types dans différentes conditions de culture : tableau 14.

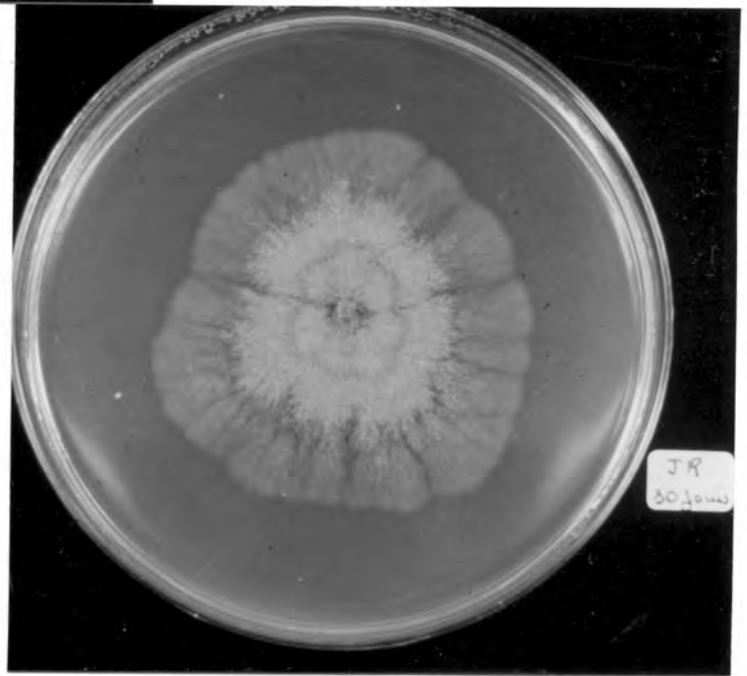
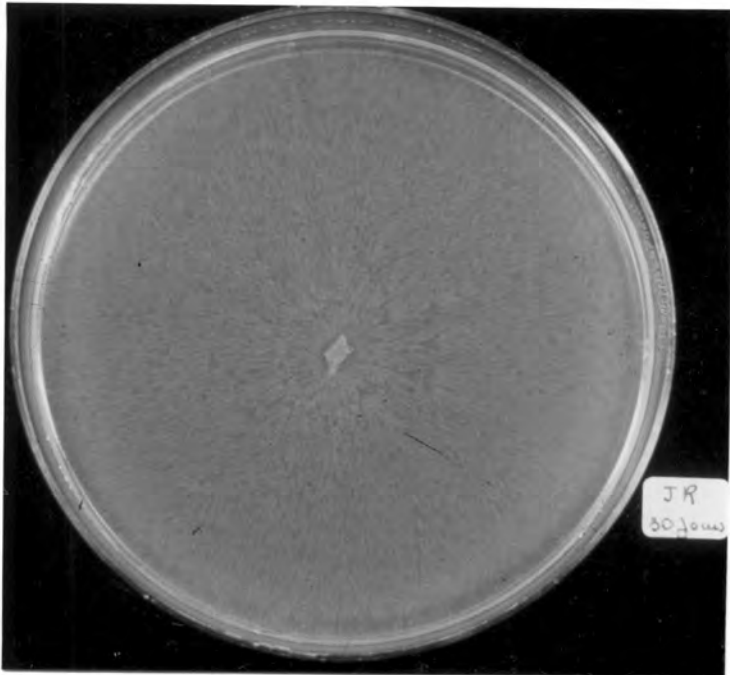


Figure 36

2 cultures du type JR
A : type JR à croissance continue (à gauche)
B : type JR à croissance limitée (à droite)
(cultures sur agar au malt 1% -30 jours à l'obscurité-)

TABLEAU 14
24th dark total
G# 1298B CAES #265 Italy 1964, healed cancer
Résultats des disjonctions en fonction des conditions de culture.

Conditions de lumière	Alternée								
	Continue				Obscurité 18 heures				
Situation de la pycnide	Prof.	Sup.	Profonde	Superficielle	Prof.	Sup.	Profonde	Superficielle	Superf.
	Age de la pycnide	50j.	50j.	50j.	14j.	50j.	34j.	14j.	50j.
% de JR obtenues	19	<u>2</u>	10	18	<u>13</u>	18	11	<u>60</u>	<u>100</u>
% de B obtenues	<u>1</u> 20	<u>22</u> 24	<u>8</u> 18	<u>22</u> 40	<u>76</u> 89	<u>76</u> 94	<u>87</u> 98	<u>15</u> 75	0
% de N obtenues	<u>80</u>	<u>76</u>	<u>82</u>	<u>60</u>	<u>11</u>	6	2	<u>25</u>	0

Les fréquences supérieures à 50% sont soulignées.

Il n'y a qu'une seule pycnide utilisée.

Nous commenterons ces résultats à la fin du présent chapitre.

Stabilité des cultures obtenues

1/ les types N présentent quelques variations; dans les tubes où sont effectués les semis monospores, les pycnides sont parfois rares, ou encore nombreuses mais petites. Après le 2e ou 3e transfert de masse, la morphologie se stabilise.

2/ dans les descendance de B et de JR apparaissent quelquefois de nouveaux types morphologiques originaux : thalles à mycélium aérien jaune clair, thalles à nombreuses pycnides minuscules mais dépourvus d'hyphe aériennes (cultures de type V), cultures ne formant pas un thalle circulaire mais des arborescences, etc.

Cependant comme précédemment, après le 2e ou le 3e transfert de masse, les cultures adoptent une morphologie qui permet de les classer sans ambiguïté dans l'un des trois types : N, B, ou JR, et les transferts successifs ne montrent désormais plus de variations.

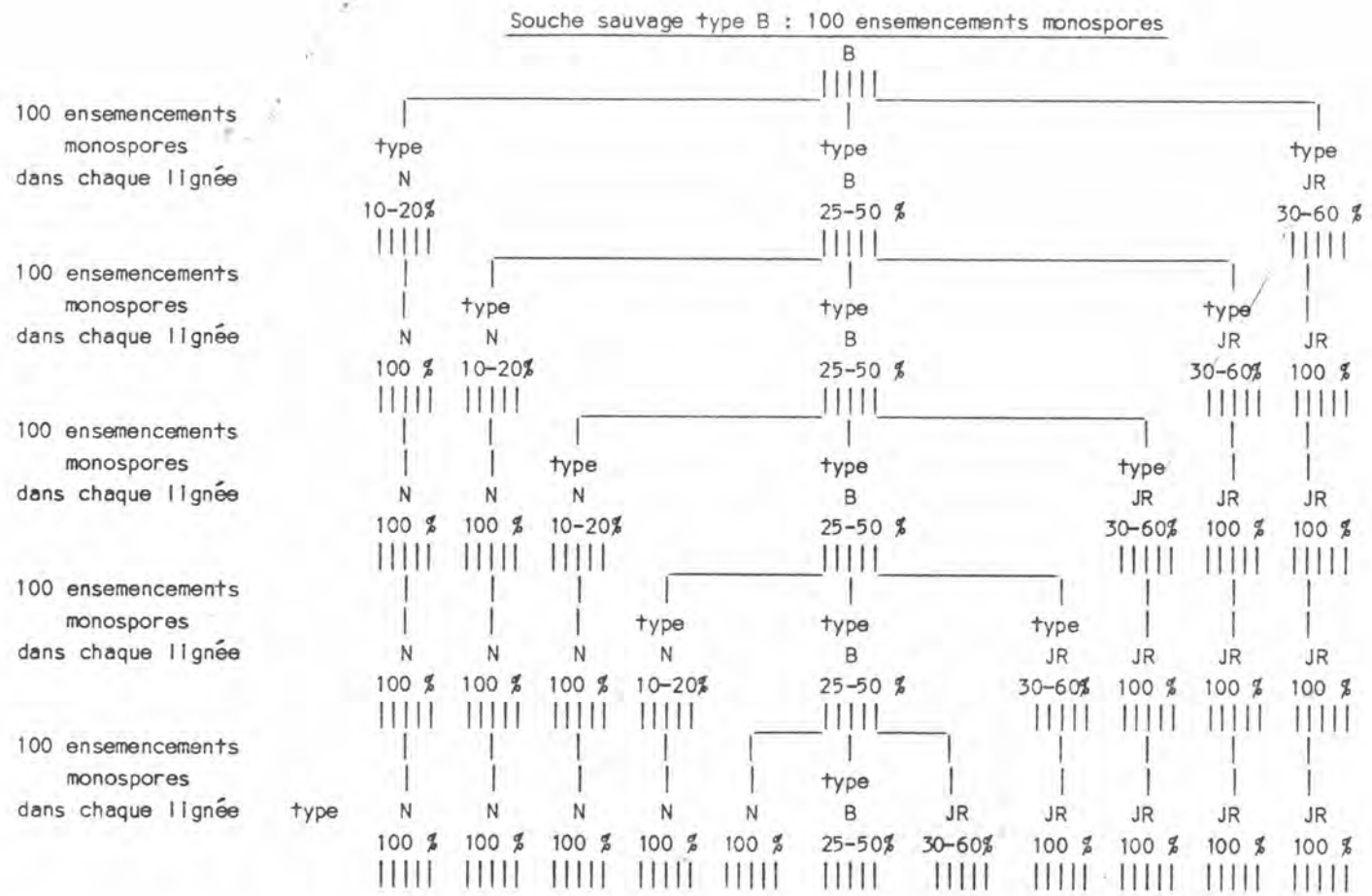


Figure 37

DIAGRAMME de Ségrégation végétative

GENERATIONS ULTERIEURES

=====

Descendance des types N (sauvages et issues de B)

=====

A partir d'une dizaine de cultures monospores obtenues en première génération, nous avons effectué pour chaque culture 100 ensemencements monospores. Quelle que soit l'origine de la culture de départ :

- culture N monospore obtenue à partir d'une souche N sauvage,
- culture N monospore obtenue dans la disjonction d'une souche B sauvage,

les cultures obtenues sont toutes du type N sans aucune exception.

La stabilité au cours des transferts est identique à celle des souches de départ.

Le type N se révèle comme "non ségrégant" au cours des différentes générations monospores (il a été étudié jusqu'à 10 générations successives).

Descendance végétative des types JR

=====

Aux réserves près de fixation définitive de la morphologie après 2 ou 3 transferts de masse, les descendance monospores ne montrent aucune disjonction; la situation est exactement la même que précédemment. Le type JR ne montre aucune ségrégation végétative au cours des différentes générations monospores.

Descendance des souches B monospores de première génération.

=====

Elle se révèle identique à la ségrégation de première génération; on obtient :

- des types N, qui par la suite ne montrent plus de ségrégation végétative par semis monospore.
- des types JR, qui restent ensuite non ségrégants.
- des types B, qui montreront à la génération suivante la même ségrégation en N, B, et JR.

L'ensemble de ces faits peut être schématisé par le diagramme de la figure 37.

Discussion et conclusions

=====

Les ségrégations végétatives obtenues à partir des souches B sauvages et des B qui en sont issues, ne relèvent pas de la ségrégation d'un hétérocaryon. Si le thalle de départ était hétérocaryotique, par bouturage d'éléments mononucléés, il ségrégerait en homocaryons stables par la suite; il ne donnerait pas d'hétérocaryons ségrégants, sauf si des spores binucléées avaient échappé à l'examen caryologique; ici, le troisième type serait l'hétérocaryon de départ; or sa fréquence est trop élevée pour qu'il soit possible de l'attribuer à une telle erreur d'observation.

La disjonction régulière à partir d'un élément uninucléé et la nature "infectieuse" du caractère contrôlé (c'est-à-dire sa capacité à être transmis d'un thalle à l'autre), sont souvent considérés comme les indices d'une hérédité extra-nucléaire. La morphologie B, et l'hypovirulence qui lui est corrélative, correspondent à ces caractéristiques. La disjonction observée serait donc celle d'un "hétéroplasmon".(1)

Un autre indice peut être trouvé dans les expériences utilisant des mutants auxotrophes. Rappelons (chapitre III p.111) que le caractère d'auxotrophie ou de prototrophie du thalle N ne change pas après la transformation en B.

Les deux confrontations symétriques :

- N auxotrophes et B prototrophes,
- N prototrophes et B auxotrophes,

montrent bien que la souche B ne transmet pas les caractères d'auxotrophie/prototrophie, alors qu'elle transmet la morphologie B. Dans la mesure où le marquage par l'auxotrophie a affecté le noyau, les tests effectués constituent des "tests hétérocaryons" tous négatifs et montrent que les noyaux ne sont pas échangés entre les deux thalles.

Le caractère B ne serait pas porté par le noyau. Ceci conforte la conclusion selon laquelle il s'agit d'un déterminisme extranucléaire.

(1) la probabilité de phénomènes de parasexualité est faible puisque le type N est stable; nous n'avons pas étudié cet aspect du problème.

Il n'en reste pas moins que la nature du mécanisme de contrôle reste totalement inconnue. En particulier, on peut envisager plusieurs hypothèses : le déterminisme pourrait être particulière ou non. Dans le terme de "non particulière", nous entendons les mécanismes dénommés "hérédités de régime" (tels les équilibres de flux décrits par DELBRUCK 1949), où des systèmes métaboliques peuvent exister sous deux états stables.

Dans les déterminismes "particulaires", on peut envisager 2 cas : les organites cellulaires, porteurs d'informations génétiques nucléiques mais non nucléaires (molécules à séquences de bases porteuses d'informations situées hors du noyau, tels les acides nucléiques des mitochondries et les plasmides), et le cas des virus.

Les présentes études de biologie appliquée ne visent pas à élucider le déterminisme intime de l'hypovirulence. Nous donnerons cependant des schémas explicatifs de tous les faits observés parce qu'ils peuvent être générateurs d'hypothèses de travail. Ils supposent l'existence d'un "déterminant" de l'hypovirulence (de nature particulière ou non), pouvant exister sous deux formes, l'une "normale" et l'autre "anormale". Le cytoplasme des différents types du champignon pourrait contenir l'une ou l'autre des formes, ou les deux, en mélange stable. Nous représentons ces deux formes du déterminant par des croix et des cercles, comme le faisaient les premiers généticiens qui ont étudié les hérédités dites "cytoplasmiques"

Nous avons bien conscience du caractère artificiel et même simpliste de ce mode de représentation, nous savons que les mécanismes de l'hérédité extranucléaire sont beaucoup plus complexes, qu'il faut tenir compte des interactions des informations génétiques du noyau avec celles du cytoplasme, que la présence de deux formes alternatives d'un déterminant est un état très généralement métastable, etc.... Nous n'accordons qu'un caractère purement indicatif aux schémas qui suivent. (figures 38 et 39 A et B, page 136).

Le premier rend compte de la disjonction végétative et exploite le fait que la pycnospore, gamète mâle par sa structure, contient peu de cytoplasme et pourrait ne prélever qu'un nombre restreint de déterminants, donc, effectuer une sélection aléatoire, dans les populations mixtes des deux formes, normales et anormales, du déterminant.

Le second rend compte de l'interaction des thalles N et B au cours de l'anastomose et explique la transformation de N en B, par migration des formes "anormales" apportées par B dans le cytoplasme de N ne contenant au départ que la forme "normale" du déterminant.

La morphologie N serait l'apanage des thalles ne possédant que la forme normale (d'où leur impossibilité de ségréger).

La morphologie JR correspondrait à la présence du seul déterminant muté (d'où son impossibilité de ségréger).

La morphologie B correspondrait au cytoplasme où coexisteraient les deux formes.

Les conséquences sont au nombre de deux :

- 1/ L'anastomose du type N avec le type JR doit donner le type B.
- 2/ Les JR doivent être hypovirulents (ce problème sera traité pour l'ensemble des souches obtenues dans les expériences de ségrégation et d'anastomose).

B - CONFRONTATION DU TYPE JR AVEC LE TYPE N.

Le document photographique de la figure 40 illustre les résultats de confrontations (sur film de cellophane). Dans le cas représenté, on constate que se forment deux secteurs intermédiaires contigus, l'un dans le thalle N, l'autre dans le thalle JR. Ces secteurs ont tous deux la morphologie B, mais de légères différences de morphologie permettent de les distinguer. On constate donc une transformation bilatérale conforme à ce que faisait attendre la figure 39 B.

Remarquons que le cas illustré est, dans sa clarté, assez rare; en général, on obtient des aspects quelque peu déroutants; l'un des secteurs intermédiaires, ou les deux, présentent souvent une morphologie anormale et ce n'est qu'après 2 ou 3 transferts de masse que les résultats se clarifient et que l'on peut vérifier que l'anastomose a donné lieu à la transformation bilatérale en B. Très souvent aussi, le contact (peut-être prématuré) du thalle JR encore indifférencié (dans ses premiers jours de culture) avec le thalle N, se traduit par une transformation immédiate du JR qui prend d'emblée le faciès B.

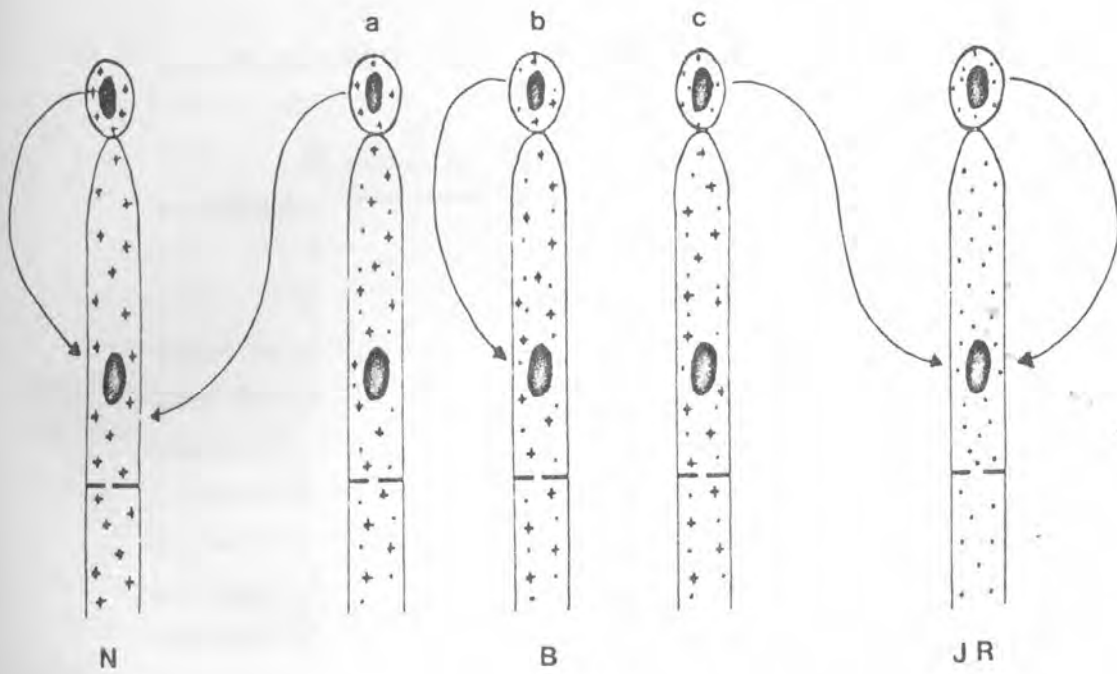


Figure 38

Schéma hypothétique tentant de rendre compte de la ségrégation végétative des souches B. L'hypothèse suppose l'existence de 2 catégories du déterminant particulière représentées par des . et des +

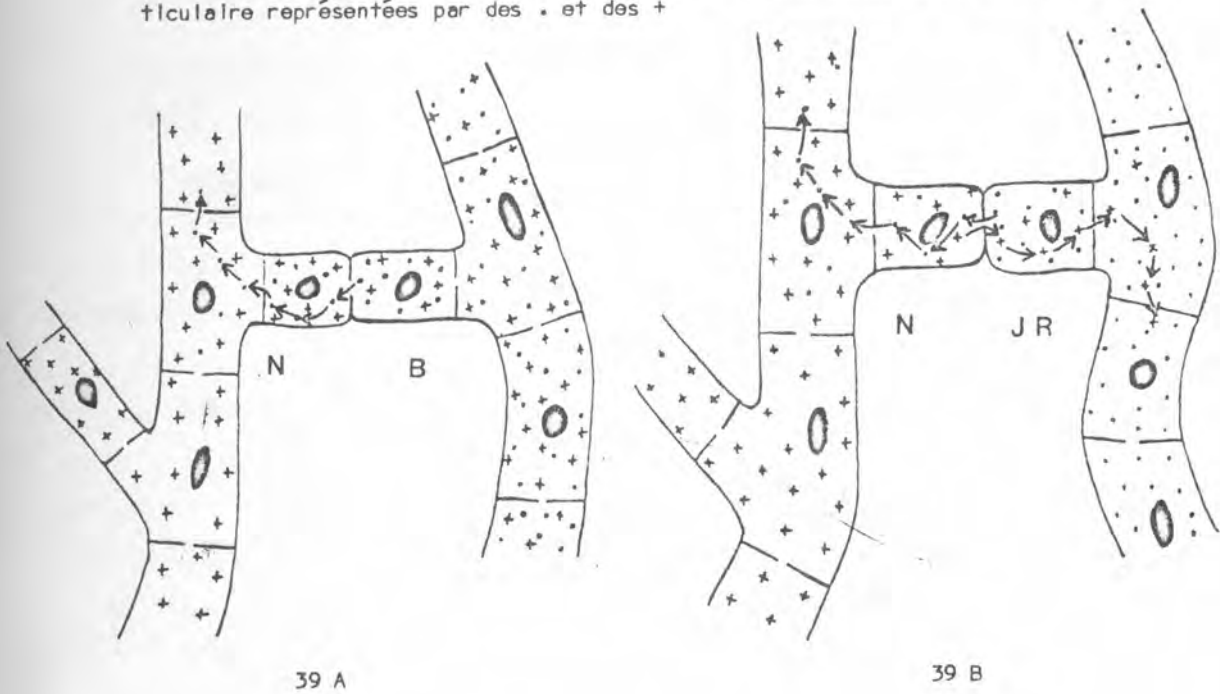


Figure 39 A et B

Schémas hypothétiques tentant d'expliquer la transformation par anastomose.
En A : anastomose N avec B donnant lieu à la transformation de N en B.
En B : d'après l'hypothèse, l'anastomose de JR avec N devrait donner lieu à une transformation bilatérale des deux types en N (voir fig. 40)



Figure 40

Anastomose de N avec JR

Conformément aux hypothèses résultant du schéma 39 B, on a obtenu
la transformation bilatérale (des deux thalles N et JR) en B.

La confrontation du type JR avec le type N conduit bien à la transformation des deux souches en B.

En dépit de ses défauts certains, le modèle aura eu le mérite de suggérer une expérience nouvelle et d'en prévoir les résultats.

Les fréquences des différents types apparus dans les disjonctions et rapportées au tableau 14 conduisent à penser que la présence dans la cellule du seul déterminant anormal (souches JR) est un état labile et soumis à une photosensibilité négative (fréquence des JR à l'obscurité de 100% pour les jeunes pycnides et de 60% pour celles de 50 jours). Sous l'action de la lumière, la viabilité des déterminants anormaux diminuerait d'où la plus grande fréquence des B dans les cultures en lumière alternée; puis, par une action plus prolongée, leur élimination totale (souches N) deviendrait plus fréquente (pourcentage supérieur des N dans les cultures en lumière continue); il s'y ajouterait un effet, de même sens, de la profondeur de la pycnide, lié probablement à l'influence des conditions d'anaérobiose partielle.

C - ETUDE DES PROPRIETES DES DIVERSES SOUCHES.

SOUCHES CONCERNEES

=====

Cette étude a concerné :

- 1° Les souches N et B obtenues dans les réisolements effectués à partir des expériences de confrontation en boîte de Petri.
- 2° Les souches N, B et JR issues des expériences de ségrégation végétative.
- 3° Les souches N et B réisolées des expériences de protection et d'exclusion réalisées sur l'hôte.

Ont été éprouvées les trois propriétés :

- a- La virulence (par mesure de la vitesse de colonisation in-vivo).
- b- Le pouvoir d'exclusion.
- c- La transmissibilité de l'hypovirulence observée.

RESULTATS.

=====

Virulence

=====

Souches N

1/ Les souches N issue de réisolements dans les confrontations compatibles ou non, ont exactement la virulence des souches de départ.

2/ Les souches N issue de la descendance monospore des N ont exactement la virulence de la souche mère quelqu'en soit le type : souche N sauvage ou N issue de B.

3/ Les souches N apparues dans la ségrégation de souches B ont une virulence comparable à celle des souches N sauvages.

4/ Les souches N réisolées des chancres surinoculés par B étaient toutes virulentes dans les premières expériences; depuis 1974 nous avons vu (chapitre II tableau 7) que certaines pouvaient être hypovirulentes.

Souches B et JR

Toutes les souches B et JR sont hypovirulentes, leur origine, fort variée, permet de les classer dans les catégories suivantes :

B1= B sauvage isolée dans les chancres spontanément cicatrisés.

B2= B apparue dans la ségrégation végétative d'une B1

B3= N sauvage transformée par anastomose in-vitro au contact d'une B ou d'une JR.

B4= B issue d'une expérience d'exclusion ou de protection (anastomose in-vivo).

Pouvoir d'exclusion et Transmissibilité du caractère B.

=====

Qu'il s'agisse de l'une ou l'autre propriété, il importe de préciser vis-à-vis de quelle souche il y a lieu de l'éprouver.

Nous connaissons le pouvoir d'exclusion et la transmissibilité

de la morphologie B chez les souches de catégorie B1 et la spécificité de ces propriétés.

Pour les autres, nous définirons ainsi les souches N à prendre en compte :

- pour les B2 : une souche N quelconque apparue dans la descendance monospore.
- pour les B3 : la souche N à l'origine de la confrontation génératrice.
- pour les B4 : la souche N à l'origine de l'expérience d'exclusion génératrice.

Nous rapporterons les résultats obtenus avec les souches dont la liste est donnée aux tableaux 15 à 17.

TABLEAU 15

Souches N de référence pour l'épreuve de compatibilité des souches B2 :
 souches N appartenant à la descendance végétative de la souche B1
 (B2 = Souche B apparue dans la descendance végétative d'une B sauvage B1)

Souche B1	Origine		Souche B2	Souche N (référence)
1659	Italie	Piastre	2016	2015
1898	Italie	Sueglio	2001	2000
2025	Collobrières	Var	2041	2047
2027	Les Mayons	Var	2037	2036
2029	Italie	Busalla	2040	2039
2030	Italie	Avellino	2056	2057
2035	Brive	Corrèze	2060	2132
2035	Ibidem		2155	2154
2101	Chirol	Ardèche	2153	2152
2124	Coretto	Corse	2125	2138
2141	Les Mayons	Var	2145	2144
2147	St Etienne de Boulogne	Ardèche	2149	2148

TABLEAU 16

Souches N de référence pour l'épreuve de compatibilité des souches B3 :
 souches N de la confrontation d'origine
 (B3 = Souche N transformée en B par anastomose in vitro)

Souche B3*	Confrontation in vitro d'origine		
	Souche N (référence)	Souche B	Nature
1976	1856	1663	compatible
2050	2024	2025	partiellement compatible
2088	2024	2050(JR)	partiellement compatible
2099	2109	2025	partiellement compatible
2100	2110	2096	incompatible
2101	2111	2096	incompatible
2113	2112	2025	incompatible
007**	935	1298	incompatible
1847	935	1663	incompatible
059**	1565	1663	partiellement compatible
114**	1662	1566	partiellement compatible
118**	935	1566	incompatible

* la numérotation définitive ayant été affectée postérieurement aux expériences, la chronologie n'est pas toujours reflétée par les numéros.

** souches non conservées en mycothèque; indicatif provisoire attribué au moment des expériences.

TABLEAU 17

Souches N de référence pour l'épreuve de compatibilité des souches B4 :
 souches N ayant servi à l'expérience d'exclusion
 génératrice de la transformation in vivo
 (B4 = Souche N transformée en B par anastomose in vivo)

Souche B3*	Confrontation in vitro d'origine		
	Souche N (référence)	Souche B	Nature
1846	935	1566	incompatible
2034	935	1663	incompatible
1889	1565	1566	compatible
046**	1565	1663	partiellement compatible
2028	1662	1663	compatible

** numérotage provisoire; souche non gardée en mycothèque

Les résultats obtenus sont :

Pour la compatibilité

Pour toutes les souches B2, B3, B4 testées, nous observons la transformation au niveau de tous les fronts de contact; elles sont donc régulièrement compatibles avec la souche N correspondante.

Pour le pouvoir d'exclusion

Les résultats qui précèdent vont être confirmés au niveau du pouvoir d'exclusion : sans aucune exception, les souches B3 et B4 ainsi que les quelques B2 testées, assurent, en 13 mois, la guérison à 100% dans toutes les expériences d'exclusion; c'est-à-dire, mieux que les B1.

Ces résultats peuvent paraître surprenants : en effet, la compatibilité et le pouvoir d'exclusion s'exercent à 100% pour toutes les B issues du laboratoire ou du champ d'expérience.

Ces performances peuvent donc être supérieures à celles de la souche B de départ (c'est le cas lorsque la compatibilité des deux souches de départ était seulement partielle ou inexistante : cas des exclusions obtenues avec des souches incompatibles).

Il est donc possible de créer des souches hypovirulentes nouvelles.

Par exemple : Souche N 935;

- pas de souche B sauvage compatible connue;
- l'expérience d'exclusion est tentée en utilisant la B 1663;
- quelques chancres cicatrisent, d'où se réisole la B 2035;
- cette souche est désormais régulièrement compatible avec N 935 : elle provoque l'exclusion des chancres de cette dernière à 100%.
- 2035 est une nouvelle souche créée par l'anastomose in-vivo.

Discussion et conclusions

De cet ensemble de résultats nous pouvons conclure que, globalement, les souches B3 et B4 présentent un pouvoir d'exclusion plus efficace que les B1 (toujours à 100%). Si cette propriété ne s'exerce évidemment qu'à l'encontre de la souche N d'origine, elle n'en constitue pas moins une arme précieuse, il devient possible de créer la souche hypovirulente nécessaire à la lutte biologique lorsqu'on ne l'a pas trouvée dans la nature.

Nous savons qu'une même souche B peut être compatible, à des degrés divers, avec plusieurs souches N. Les souches B3 et B4, dont le pouvoir d'exclusion se révèle souvent supérieur à celui des B1 (quantitativement meilleur vis-à-vis d'une souche N particulière), vont-elles aussi présenter un spectre de compatibilité plus étendu? En d'autres termes, cette propriété s'exercera-t-elle à l'encontre d'un nombre plus élevé de souches N? Dans ce cas il y aurait, outre une amélioration quantitative, une amélioration qualitative du pouvoir d'exclusion.

Les réponses apportées sont tantôt positives, tantôt négatives. Il n'y a, en effet, aucune raison logique de comparer aux B1, ni les B3 ni les B4, qui ne sont en fait rien d'autre que les N transformées, infectées par l'hypovirulence des B1, mais ayant conservé l'essentiel de leurs potentialités génétiques.

Les différentes classes de souches B non sauvages, sont bien des souches nouvelles créées par l'anastomose.

Quand une souche B1 ne se révélait pas régulièrement compatible, la cause en était aux mécanismes réduisant les chances d'anastomose viable (incompatibilité végétative). Si on a pu résoudre une souche B3 ou B4, c'est que, fortuitement, ces barrières n'ont pas fonctionné; on a créé un nouveau type B en associant le déterminant de l'hypovirulence avec le type nucléaire du N. Il n'y a plus d'incompatibilité végétative, le pouvoir d'exclusion est amélioré.

Ce mode de raisonnement suppose que la compatibilité végétative est sous le contrôle prioritaire des déterminants nucléaires sans interférence de l'hypovirulence.

Les souches B2 issues de la ségrégation végétative ne présentent aucune originalité par rapport aux souches de départ, ce qui résulte du caractère purement endogène de leur filiation: même noyau, même cytoplasme.

Compatibilité d'anastomose, compatibilité entre N et B pour la transmission de la morphologie B et de l'hypovirulence, pouvoir d'exclusion relatif à une combinaison de souches N et B, tiennent à un seul et même mécanisme.

S.ANAGNOSTAKIS a décrit, sous le nom de "Vegetative compatibility", un phénomène voisin. Il est utile de connaître les relations éventuelles entre les deux systèmes.

Comparaison des systèmes de compatibilité.

=====

Rappelons que S.ANAGNOSTAKIS et alias ont défini des "VC.groups", ou groupes de "compatibilité végétative", qui affectent la confrontation des souches N entre elles. Dans le cas de coïncidence des groupes, les thalles s'interpénètrent, les pycnides apparaissent sans localisation préférentielle; si au contraire, les groupes sont différents, elles sont localisées le long du front de contact. Cette réaction peut être interprétée comme un barrage (phénomène bien connu, décrit par exemple chez le Podospora anserina).

Pour les auteurs américains, cette réaction est, chez l'Endothia, le signe d'une incompatibilité entre les deux souches, sous le contrôle de six gènes; la compatibilité nécessitant l'identité des six, ce qui définirait 64 groupes (2 puissance 6)

Admettant la transmission régulière entre souches du même groupe, ces auteurs pensent que la détermination préalable du "V.C.group" permettrait de classer les souches virulentes et de sélectionner des souches hypovirulentes pour chacun d'entre eux.

Nous avons étudié les relations entre la compatibilité végétative ainsi définie et celle que nous connaissions. La technique s'applique à des souches N, on ne peut donc pas déterminer le groupe d'une souche B de façon directe; il ne peut être connu que dans 2 cas particuliers:

1/ La souche B provient d'une confrontation. Elle n'est alors qu'une N modifiée; son groupe est donc celui de cette souche.

2/ Elle est, en ségrégation végétative monospore, à l'origine d'une souche N dont on a déterminé le groupe.

Disposant dans notre collection de souches B qui répondent à ces caractéristiques, il devient possible d'étudier les rapports entre les deux systèmes de compatibilité.

Dans un premier temps nous avons déterminé le "VC.group" de toutes les N disponibles (par la méthode de S.ANAGNOSTAKIS modifiée par S.BERTHELAY-SAURET).

Nous n'avons trouvé pour le moment que 20 groupes de compatibilité végétative, les effectifs y sont fort variés, certains sont représentés par une seule souche.

Pour les souches B, le tableau 18 décrit celles dont nous avons pu déterminer le groupe; tous les groupes trouvés pour les N ne sont pas représentés.

Dans un deuxième stade, nous avons confronté toutes les N avec tous les B dans toutes les combinaisons possibles (8 confrontations pour chaque combinaison)

Les résultats concernant les souches B de groupe identifié sont rapportés au tableau 19.

On en tirera les conclusions suivantes :

1° CONFRONTATIONS ISO-GROUPES : lorsque les souches appartiennent au même groupe, l'hypovirulence est généralement transmise de façon régulière (100%).

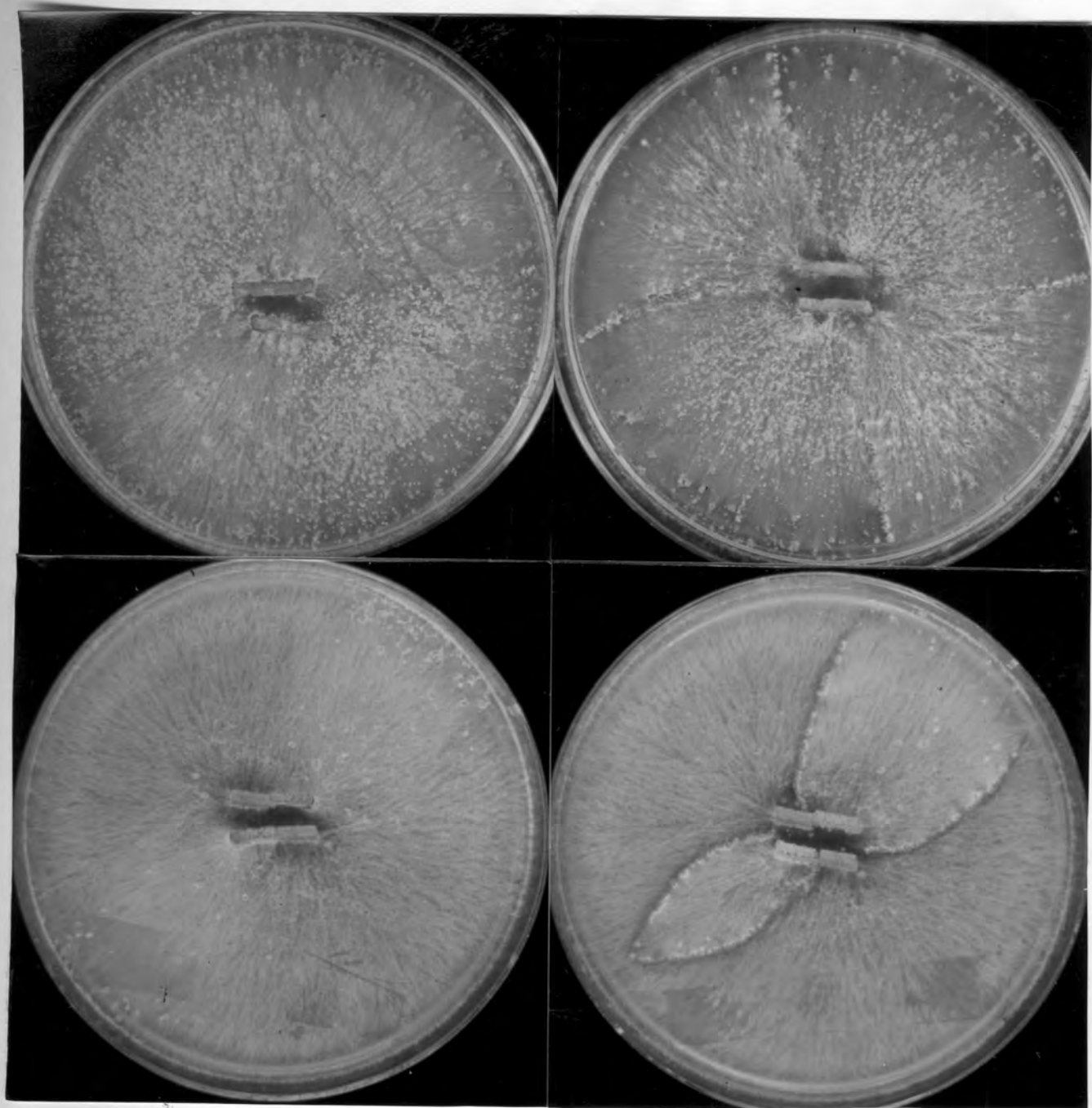


Figure 41

Quatre cas de détermination du "VC group"

Les deux photographies de gauche illustrent des confrontations isogroupes, celles de droite des hétérogroupe. Le "VC group" n'est pas lié à la morphologie de la souche N : les deux photographies du haut concernent des souches N de morphologies voisines; les deux de gauche sont du même groupe, celles de droite, de groupes différents; les deux photographies du bas concernent, à gauche, deux souches du même groupe fort différentes morphologiquement (l'une d'elles possède un mycélium jaune assez inhabituel), la photographie de droite montre deux souches différant à la fois par la morphologie et le groupe de compatibilité.

2° CONFRONTATIONS HETERO-GROUPES : la situation est plus complexe : elle peut s'exprimer par 3 cas :

- il n'y a pas de transmission;
- une interaction aléatoire se manifeste;
- la transmission se produit fréquemment et pour plusieurs souches du groupe .

Ces faits sont à rapprocher de la réussite d'exclusions entre souches incompatibles; ils rappellent aussi beaucoup les interactions aléatoires où les anastomoses n'étaient pas viables mais certaines duraient suffisamment pour permettre le passage du déterminant de l'hypovirulence.

La possibilité de transmission hétéro-groupe est un fait nouveau.

Dans le cas de ces confrontations entre N, nous n'avons pas examiné le comportement des anastomoses au niveau microscopique. Selon S.ANAGNOSTAKIS (communication personnelle) il y aurait dégénérescence si les groupes sont différents, la connaissance de leur longévité permettrait de savoir si dans les cas de compatibilité hétéro-groupe, se retrouvent les modalités décrites dans les confrontations à interaction aléatoire (Chap.III, p.110).

Le "VC group" peut apparaître comme un moyen de caractérisation des souches N. Est-il suffisant pour les définir complètement : certainement pas; des souches de même groupe peuvent présenter des différences importantes, ne serait-ce que pour la morphologie du thalle en culture. C'est ce qu'illustre la figure 41, page 144 bis.

TABLEAU 18

Identification du groupe des souches B

Souche N identificatrice				souche B
Indicatif	Groupe	Origine géographique		identifiée
1 / Souches issues d'anastomoses				
2110	3	Sablières	Ardèche	2100
1662	2	La Garde Freinet	Var	2028 *
2023	4	Gonfaron	Var	2022
1657	3	Lima	Italie	2063
2031	2	Turin	Italie	2067
1955	2	La Garde Freinet	Var	2069
1662	2	Les Mayons	Var	2140
2068	2	La Garde Freinet	Var	2073
2070	2	La Garde Freinet	Var	2074
2095	2	Gonfaron	Var	2076
2023	4	Gonfaron	Var	2079
2 / Souches issues de ségrégation végétative				
2044	2	La Garde Freinet	Var	2028 *
2144	4	Les Mayons	Var	2141
2047	4	Collobrières	Var	2025
2062	5	Malemort	Corrèze	2035
2126	2	Coretto	Corse	2124
2138	2	Coretto	Corse	2125
2039	2	Alba	Italie	2029
2058	2	Turin	Italie	2032

* Souche de groupe connu par les deux procédés.

TABLEAU 19

Tableau des compatibilités des souches de groupes connus

		souches N compatibles des groupes (1)									
Groupe N°		1	2	3	4	5	6	7	10	11	
Effectif du Groupe		2	11	3	8	4	1	1	1	1	
Souche B	Groupe										
(2)	(3)										
2028	2		10								
2067	2		9								
2069	2		5								
2022	2		11		2						
2073	2		11		1						
2074	2		11		2						
2096	2		11		3						
2124	2		11			1					
2125	2		9								
2029	2		11								1
2032	2		11	1							
2100	3	2(f)	1	3	2(f)				1	1(f)	
2063	3		7	3				1			
2140	4		1		7						
2079	4		1		8		1				
2141	4	1	9		8						1
2025	4	1(f)			8	1	1				
2035	5					3					

(1) souches N de groupes connus confrontées

(2) souche B de groupe identifié

(3) groupe de la souche B

La complexité des relations entre compatibilité végétative et transmission de l'hypovirulence est grande.

Lorsque dans un groupe, existent plusieurs souches B, il arrive que certaines ne soient pas compatibles avec toutes les N du groupe. Elles peuvent, par contre, l'être avec des N d'autres groupes.

Si le "V.C group" est un moyen précis d'identification des souches, il ne constitue pas un système suffisant pour justifier des phénomènes complexes de reconnaissance inter-cellulaire, de mélange viable des cytoplasmes qu'implique une anastomose. Il ne rend pas compte des propriétés importantes que nous utilisons dans la lutte biologique.

CONCLUSIONS

L'étude de la ségrégation végétative montre que l'hypovirulence est très vraisemblablement contrôlée par des déterminants extra-chromosomiques.

Un modèle hypothétique (et quelque peu simpliste) a été proposé, il rend compte non seulement de tous les faits expérimentaux, mais il a même suggéré une expérience intéressante puisqu'elle a montré que l'anastomose du type JR avec N donnait une transformation bilatérale (des deux thalles) en B.

Le type JR apparu dans ces études est, dans l'état de nos connaissances, une création de laboratoire. Son hypovirulence et sa stabilité en descendance monospore pourrait le faire considérer comme porteur de l'hypovirulence "à l'état pur" (selon le modèle proposé, il ne contient que le déterminant cytoplasmique anormal).

Les relations de compatibilité pour la transmission de la morphologie B, c'est-à-dire de l'hypovirulence, avec la compatibilité d'anastomose végétative nous montrent que des mécanismes complexes de

reconnaissance et de viabilité cytoplasmique devraient être étudiés sur le plan biochimique et ultrastructural pour une meilleure compréhension de cet important problème. Il n'est peut-être pas utopique de penser transmettre l'hypovirulence à une autre espèce pathogène que l'Endothia.

Bien des points restent dans l'ombre : la nature exacte des déterminants de l'hypovirulence, leurs interactions avec le fonctionnement cellulaire, leurs effets sur le métabolisme, les mécanismes de leurs actions sur le pouvoir pathogène.

La connaissance de la nature intime de l'hypovirulence a progressé depuis que l'équipe de PETER DAY (Connecticut Agricultural Experiment Station de NEW HAVEN) a mis en évidence des acides ribonucléiques bicaténaires dans les souches hypovirulentes et même, dans certains cas, des "pseudo-virus" -virus like particles- (DAY P.R., 1978 DODDS J.A., 1978).

Repris par l'équipe de LAPIERRE à la Station de Pathologie du C.R.A de VERSAILLES, ces résultats ont été confirmés et un test utilisant les propriétés immunologiques de la membrane des "pseudo-virus" mis au point, il sera utilisé dans les futures recherches sur la transmission et l'épidémiologie de l'hypovirulence.

Les données acquises, bien que fragmentaires, vont nous permettre d'envisager une application pratique : utiliser les propriétés des souches hypovirulentes dans la lutte biologique.

Note : Les expériences de transformation par confrontation in vitro ont été pratiquées par toute une série de dispositifs légèrement différents; nous ne pouvons donner toutes les illustrations correspondantes. Deux photographies nous paraissent particulièrement instructives; nous les donnons au verso (figure 42 A et B, page 149 bis) :

- en A : la 1ère confrontation in vitro effectuée (1966). L'ensemencement est réalisé par des fils de coton trempés dans des broyats des deux cultures (technique utilisée dans l'équipe de J.CHEVAUGEON à Orsay).
- en B : technique utilisant 3 implants de taille différente.

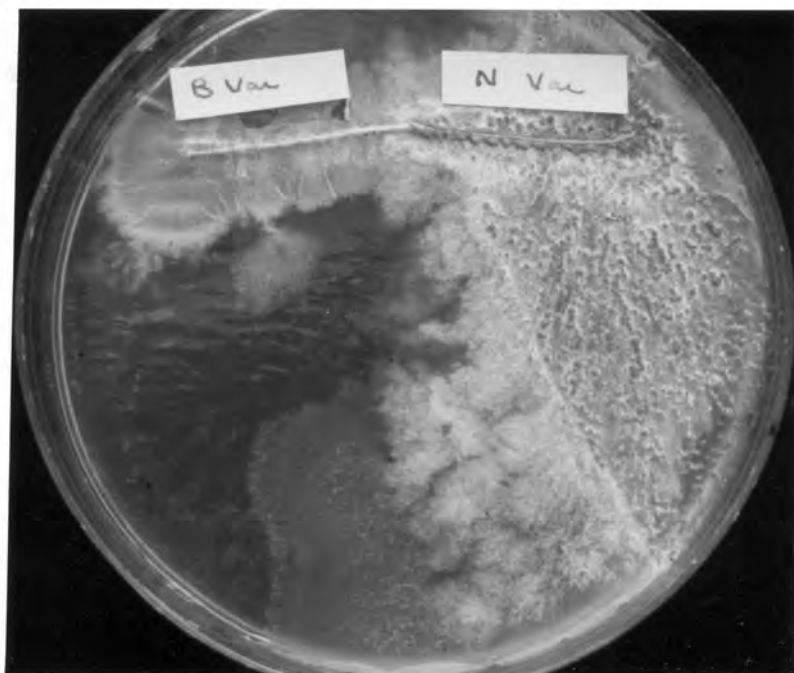


Figure 42 A

Première expérience de transformation In vitro sur cellophane (1966)
La souche B a une croissance particulièrement lente; la transformation de N est particulièrement bien visible. A noter que la droite qui limite la zone de pycnides ne passe pas par le point de rencontre des deux inoculum, ce qui peut être prévu par le raisonnement.



Figure 42 B

Dispositif à 3 implants (2 petits de B encadrant un long de N)
Ce dispositif permet d'observer un secteur N non transformé assez grand, même lorsque la transformation est très rapide (Ici encore, la limite des pycnides ne passe pas par le point de contact des implants).

CHAPITRE V

LUTTE BIOLOGIQUE et EPIDEMIOLOGIE

A - LA LUTTE BIOLOGIQUE

GENERALITES

PRINCIPES DE L'APPLICATION

Expérimentations préliminaires
Résultats

MODALITES PRATIQUES DE LA LUTTE BIOLOGIQUE

B - EPIDEMIOLOGIE DE L'HYPOVIRULENCE

METHODOLOGIE PROVISOIRE

La notion de Flux de germes d'hypovirulence
Le pouvoir d'émission
 Le pouvoir émissif
 Les capacités de dispersion
 Le flux reçu
Corrélations finales

LA NOTATION DES CHANCRES

ETAT ACTUEL DU TRAVAIL

Notation des chancres
 Corrélation : Note - Comportement
 Système de calcul
Etude et calcul du pouvoir émissif
Etude sur les capacités de dispersion
Etude du champ
Calcul du champ composite en un point
Corrélation finale - Résultats
Discussion

LUTTE BIOLOGIQUE et EPIDEMIOLOGIE

A - LA LUTTE BIOLOGIQUE

GENERALITES

=====

Les expériences d'exclusion ont montré qu'il était possible de provoquer la guérison des chancres par surinoculation au moyen d'une souche hypovirulente (de préférence compatible).

L'observation des plantations italiennes a montré que l'hypovirulence se généralisait spontanément, la vitesse de cette dissémination est telle qu'en 30 ans, la maladie régresse au point de ne plus poser de problèmes à l'agriculteur.

Dans la perspective d'une application agronomique et devant la nécessité d'entreprendre la protection de la châtaigneraie, on devait, dès le départ, adopter plusieurs postulats :

1°) l'hypovirulence était, en France, inexistante ou trop rare pour jouer un rôle réel; mais il devait être possible de l'introduire.

2°) la surinoculation des chancres dans les châtaigneraies par des souches hypovirulentes devait permettre :

a) -de provoquer la cicatrisation comme dans les expériences d'exclusion.

b) -d'introduire des souches qui seraient ensuite disséminées par les vecteurs naturels.

c) -d'augmenter les chances et la vitesse de dissémination de l'hypovirulence en fonction directe de la densité des introductions

A partir de là, nous avons instauré des expérimentations pour mettre au point une méthode pratique de lutte.



Figure 43

○	Arbre traité
□	Arbre charcreux non traité
△	Arbre sain

Parcelle de Mr. FOURNIER
à PIED DE BORNE (48)
échelle : 1 cm = 1 m.



PRINCIPES DE L'APPLICATION
=====

Expérimentations préliminaires
=====

Dans les parcelles atteintes de la châtaigneraie fruitière du massif des Maures, la maladie se présentait en 1967 sous forme de foyers ^{center} de 5 à 10 chancres chacun et, selon les cas, on observait de 1 à 10 foyers par hectare (figure 43).

Pour introduire les souches hypovirulentes dans le milieu naturel, nous avons surinoculé quelques chancres par foyer (2 à 3), ^{ouverts} selon les modalités antérieurement décrites.

On poursuivait ainsi un double but :

1°) -démontrer aux agriculteurs que le traitement permettrait d'arrêter l'évolution des lésions et éviterait la perte de l'organe attaqué; c'était à cette époque l'aspect le plus attractif de l'action.

2°) -permettre une étude de l'extension de l'hypovirulence aux chancres non traités voisins du point de traitement.

La période de traitement a duré 3 ans.

En septembre 1967, nous avons traité dans la commune des MAYONS 200 chancres parmi le millier répertorié sur 12 parcelles, à raison de 10 chancres par hectare en moyenne. La souche utilisée était la B 1663, originaire du Var (nous avons pris la précaution d'utiliser une souche hypovirulente locale).

Au printemps suivant, les chancres traités ne s'étaient pas étendus en surface dans la majorité des cas; aucun n'avait entraîné la mort de l'arbre.

Les autres avaient provoqué la mortalité habituelle (5 à 8% des organes atteints l'année précédente).

Nous avons appliqué le traitement :

1/ sur certains des chancres nouvellement apparus, soit dans de nouveaux foyers, soit dans la zone d'extension des anciens;

2/ sur quelques uns des arbres traités à l'automne et dont l'évolution ne nous paraissait pas ^{très} suffisamment freinée.

En 1969, nous avons opéré de la même façon.

Résultats

=====

Si le premier objectif était donc atteint quelques mois après le début du traitement, le second ne le fut qu'en 1971. En 1970, sur les chancres non traités, la maladie continuait d'évoluer à la même vitesse.

Dès 1971, les premiers cas de cicatrisation de chancres non traités étaient repérés dans un rayon de 5 mètres autour des points d'introduction de la souche hypovirulente. Le dispositif expérimental n'était pas assez précis pour permettre d'affirmer qu'il y avait aussi une diminution de la mortalité dans ce périmètre.

Par la suite (1972 à 1974), les observations annuelles ont montré que la maladie régressait : la fréquence des mortalités diminuait nettement, de même que celle d'apparition de nouveaux chancres évolutifs.

En 1968-69, nous avons été amenés à étendre le traitement dans les communes de GONFARON et de COLLOBRIERES. Le faible pourcentage de réussite dans la première de ces communes nous conduisit à une analyse de la compatibilité des souches. Elle montrait, en 1970, que la souche B 1663 (groupe 2), n'était pas compatible avec la N 2023 (groupe 4) qui sévissait à GONFARON; pour résoudre le problème, nous avons résolu d'un chancre cicatriciel traité la B 2025, utilisant pour la première fois la technique de l'anastomose forcée sur l'hôte.

On décidait donc de porter une attention particulière à l'ajustement des souches hypovirulentes aux souches virulentes localement présentes. A partir de ce moment, la technique de lutte était définitivement fixée dans ses grandes lignes.

De 1972 à 1980, la lutte fut étendue à l'ensemble de la châtaigneraie des Maures puis, à partir de 1973, à certains cantons castanéicoles de l'Ardèche et du Gard.

La réussite complète de la lutte : cicatrisation des chancres traités, apparition de guérison spontanée de chancres non traités dans le périmètre des traités (à 5-10 mètres), devait amener en 1975-1976 la constitution d'un service de lutte biologique financé par le Ministère de l'Agriculture et nous permettre d'étendre la méthode à l'ensemble de la châtaigneraie française.

L'organisation du service de Lutte Biologique est un ensemble assez complexe dont les activités sont variées.

MODALITES PRATIQUES DE LA LUTTE BIOLOGIQUE

=====

1°) -la lutte n'est appliquée qu'aux châtaigneraies entretenues

La première tâche est donc l'enquête pour la délimitation des zones atteintes et, à leur intérieur, des parcelles qui justifient cette lutte. L'opération est effectuée par les techniciens "de terrain" du Service. Elle donne lieu à l'établissement d'un répertoire et d'une cartographie, et parallèlement, à des prélèvements d'échantillons d'écorce malade.

2°) -avant la mise en place des campagnes de traitement, on sélectionne au laboratoire, à partir des échantillons prélevés sur le terrain, les souches hypovirulentes compatibles à utiliser. Les deux phases sont:

a/ l'isolement des souches virulentes, leur purification, leur mise en mycothèque : opérations demandant de 2 à 3 semaines.

b/ la sélection des souches hypovirulentes compatibles, au moyen de confrontations systématiques en boîtes de Petri selon la stratégie suivante :

10 souches hypovirulentes constituant "l'arsenal" principal du laboratoire sont d'abord utilisées. Dans 95% des cas, cette épreuve permet de sélectionner une ou plusieurs souches B compatibles.

Dans les cas négatifs, jusqu'en 1978 on cherchait à créer une nouvelle souche par la méthode des anastomoses forcées in-vitro; pour les cas rebelles (deux, rencontrés entre 1972 et 1978), on opérait de même, mais in-vivo : sur l'hôte.(1)

Depuis 1978, grâce à la technique des inoculums en pâtes, nous pouvons utiliser des mélanges de souches ce qui est plus simple et encore plus efficace.

3°) -parallèlement, les techniciens de terrain assurent la sensibilisation des producteurs et leur formation technique par des réunions d'information, des démonstrations pratiques, par la distribution de la documentation adéquate.

(1) La méthode "des anastomoses forcées", est utilisée soit in-vitro en réalisant une centaine de confrontations au lieu des 8 habituelles, soit "sur l'hôte" : on surinocule avec une B une dizaine de chancres obtenus par inoculation de la souche N en cause.

Ils planifient ensuite les opérations qui vont se dérouler pendant les campagnes de traitement. Après ^{entente} ~~entente~~ avec les producteurs et les autorités locales, ils établissent la cartographie détaillée des parcelles à traiter et évaluent les besoins en différentes souches hypovirulentes ou mélanges, selon les résultats établis par le laboratoire.

4°) -le laboratoire procède alors à la fabrication des quantités d'inoculum nécessaires pour chacune des souches à utiliser. Nous avons utilisé un inoculum en pellets préparé en flacons jusqu'en 1975, technique lente mais peu coûteuse et qui suffisait aux besoins des premières années de lutte. L'extension de l'action a nécessité de trouver des méthodes de production plus efficaces. C'est alors que nous avons mis au point une technique de culture en fermenteurs ainsi qu'un appareillage tout à fait spécifique et de coût réduit.

Depuis 1978, la technique des inoculums en pâtes a complètement supplanté les pellets, un appareillage léger est venu remplacer la batterie de fermenteurs.

5°) -les campagnes de traitement se déroulent en deux phases principales : avril-mai et septembre-octobre. L'inoculum est distribué aux agriculteurs qui effectuent le traitement.

6°) -les techniciens contrôlent l'application et éventuellement, aident les agriculteurs à corriger les erreurs qui auraient pu être commises; en même temps ils contrôlent les résultats obtenus par les traitements antérieurs; en cas d'échec, ils peuvent prélever des échantillons qui seront envoyés au laboratoire pour examen et étude sur l'origine des incidents.

7°) -des notations sont ensuite exécutées sur les parcelles dites "de contrôle", pour étude de l'épidémiologie de l'hypovirulence, on en attend une évaluation objective des résultats de la lutte.

8°) -le laboratoire travaille à l'étude de l'épidémiologie, ce qui comporte une mise en fichier de toutes les données et leur traitement informatique.

B - EPIDEMIOLOGIE DE L'HYPOVIRULENCE

L'étude de la dissémination des souches hypovirulentes est un travail qui, à notre connaissance, n'a jamais été abordé. Il s'agit en effet d'une épidémie au second degré : l'Endothia est une maladie épidémique, et l'hypovirulence une maladie épidémique de l'Endothia. Les outils mathématiques et statistiques sont à mettre au point en collaboration avec des biométriciens.

On ne peut cependant pas attendre de disposer de cette méthodologie précise, car le facteur temps impose une contrainte immédiate : la dissémination spontanée modifie rapidement le milieu comme nous l'apprennent les études poursuivies sur la châtaigneraie italienne.

En France, dans certaines régions (Ardèche, Maures, Gard), les souches hypovirulentes sont devenues si communes qu'il devient difficile de démontrer l'influence de nouvelles introductions contrôlées sauf dans quelques situations favorables : Lozère, zones d'altitude du Gard et de l'Hérault, et surtout dans les départements plus récemment atteints : Cantal et Dordogne.

En conséquence, il est urgent de recueillir immédiatement le plus grand nombre de données possible, d'étaler au maximum la variété des paramètres mesurés et de répéter les mesures à des intervalles de temps rapprochés, même au risque de collecter des informations redondantes ou inutiles.

Pour cette raison, nous avons établi depuis le début de 1979 un réseau de parcelles dites "de contrôle", où 800 chancre de châtaigneraies traitées et 245 de parcelles témoins, sont répertoriés, cartographiés et examinés (tableau 20).

Pour exploiter les données, nous avons adopté une méthodologie provisoire.

Le premier objectif poursuivi était de savoir si les traitements améliorent l'état sanitaire de la châtaigneraie, c'est-à-dire si les chances de guérison d'une lésion non traitée sont accrues au voisinage des chancre traités.

TABLEAU 20

Caractéristiques des parcelles de contrôle (au 31 déc.1979)

Localisation	Nbre de ^{stems injured} tiges atteintes	Nbre de chancres
Parcelles traitées entre 1974 et 1980		
MEYRAS (07)	28	50
MONTPEZAT(07)	61	69
GAN (64)	65	160
CASTANET 1e HAUT (34)	46	52
FRAYSSE (34)	57	76
MONOBLLET (30)	42	63
GENOLHAC (30)	48	63
PONTEILS (30)	15	32
SOUSTELLE (30)	11	23
ARRE (30)	82	99
PIED de BORNE (48)	37	41
POURCHARESSES (48)	25	67
ST JULIEN des POINTS (48)	44	54
<u>TOTAL</u>	561	800
Parcelles non traitées		
MEYRAS (07)	43	34
MONTPEZAT 507)	43	62
COLOGNAC (30)	61	62
St ETIENNE -		
Vallée Française (48)	32	35
LE COLLET de DEZE (48)	48	52
<u>TOTAL</u>	227	245

METHODOLOGIE PROVISoire

=====

La notion de Flux de germes d'hypovirulence

=====

La dispersion de l'Endothia est assurée principalement par des fragments d'écorce infectés, transportés par des vecteurs (insectes, oiseaux, agents météoriques, etc...) encore très mal identifiés; s'ils proviennent d'un chancre "cicatriciel", ils peuvent véhiculer un thalle hypovirulent; leur dépôt sur une lésion évolutive risque d'entraîner l'infection du thalle virulent et sa transformation.(1)

Nous considérons donc tout chancre abritant un thalle hypovirulent comme une source émissive potentielle de germes créant autour d'elle un champ qui, en tout point, sera fonction du pouvoir d'émission de la source et de la loi qui en régit le gradient, laquelle dépend de la biologie des vecteurs. On doit aussi admettre qu'on est en présence d'un champ composite, résultante des champs élémentaires créés par chacune des sources émissives. Tout chancre situé dans le champ va, de ce fait, recevoir au cours du temps des germes en quantité croissante par sommation; ses chances de cicatrisation vont donc augmenter. Les figures 46 à 48 illustrent les concepts exposés ci-dessous.

Le pouvoir d'émission

=====

Il doit être considéré comme la résultante d'au moins deux paramètres.

Le pouvoir émissif

Tout chancre abritant un thalle hypovirulent, en totalité ou en partie, est considéré comme une source de "germes d'hypovirulence".

(1) Les pycnospores jouent, dans la dissémination de l'hypovirulence, un rôle similaire mais réduit du fait : d'une part, de leurs très faibles capacités d'infection et d'autre part, de leur production moins abondante par bon nombre de souches hypovirulentes.

à la disposition des vecteurs. Le pouvoir émissif, caractère intrinsèque, d'un chancre résulte de la surface exposée aux vecteurs et de la proportion de thalle transformé en hypovirulent.

Dans l'hypothèse minimale où l'on considère que le thalle doit être mis à nu pour être disséminé, on pourrait par des mesures de surface et des déterminations de virulence (prélèvements, isolements, inoculations), évaluer les paramètres principaux de ce "pouvoir émissif" qui va caractériser chaque chancre, à un moment déterminé.

Mais il n'est pas possible de mesurer ces paramètres sur tous les chancres étudiés; les études sur l'évolution des lésions nous portent à conclure actuellement que, pour les chancres traités, le pouvoir émissif est élevé et qu'il s'accroît avec le temps, au cours du processus de cicatrisation : la proportion de thalle modifié augmente, de même que son accessibilité aux vecteurs (les fentes longitudinales étendent la surface des tissus infectés exposés à l'air).

Faute de connaissances, nous sommes réduit à tester des hypothèses sur la loi de progression du pouvoir émissif en fonction du temps.

Dans une première approximation, nous avons considéré que seuls les chancres traités sont potentiellement émissifs pour l'hypovirulence (on sous-estime ainsi l'émission, ce qui ne nuit nullement à l'hypothèse testée), et ce, depuis la date du traitement. Dans un second stade (après avoir trouvé une méthode fiable pour mesurer le caractère cicatriciel), nous avons considéré que le pouvoir émissif était égal au produit de la note de cicatrisation par la surface du chancre.

Les capacités de dispersion

Un chancre intrinsèquement émissif possède une aptitude plus ou moins grande à servir réellement de source émissive. Evaluer ces capacités nécessite de connaître les vecteurs ou de tester toute une série d'hypothèses sur leur nature. Dans la phase actuelle, nous sommes réduit à cette dernière solution.

En première approximation, on définira le pouvoir dispersif comme le produit du pouvoir émissif par la capacité de dispersion. On évaluera pour chaque chancre autant de valeurs différentes de ce critère que d'hypothèses testées. Dans le premier stade, on l'a supposé égal pour tous les chancres (ce qui minimise l'évaluation).

Le flux reçu

Par l'émission et la dispersion des "germes d'hypovirulence", se crée un flux qui, selon les hypothèses que l'on choisira d'une dispersion aléatoire ou polarisée, atteint les différents points de la châtaigneraie, ou certains points seulement.

Il serait nécessaire de connaître la loi qui permet de calculer le champ en tout point.

Nous ferons l'hypothèse qu'elle est surtout régie par la distance et, bien entendu, que le champ diminue au fur et à mesure qu'on s'éloigne de la source émissive. On a testé 3 modèles de loi : 1er, 2ème et 3ème degré :

le premier équivalent à peu près à l'hypothèse d'un vecteur se déplaçant de chancre en chancre directement en ligne droite, ses chances d'atteindre un point donné diminuant linéairement quand la distance augmente;

le second, à celui d'un vecteur se déplaçant sur une surface; et le troisième, à un vecteur volant ou à un facteur météorique comme le vent (ce ne sont que des approximations, en réalité le déplacement des vecteurs est probablement polarisé).

On considérera qu'en un point, le champ composite est la somme des champs élémentaires engendrés par chaque source.

Il faudrait ensuite faire la sommation dans le temps, c'est-à-dire :

1° définir des intervalles de temps pendant lesquels le champ peut être considéré comme constant;

2° faire la somme des produits de la valeur du champ composite par la durée des intervalles de temps.

Cette opération nécessiterait de connaître l'âge de chaque lésion ou de l'évaluer d'après sa surface. Faute de cette connaissance, nous avons dû adopter une simplification : le flux reçu est supposé constant sur une période d'un an (les notations disponibles sont d'ailleurs annuelles).

Toutes ces approximations contribuent à sous-évaluer le flux reçu. Si donc on peut trouver une corrélation avec l'évolution, elle ne sera que plus probable.

Corrélations finales

=====

La méthodologie de cette étude va donc être :

1°) -d'observer l'évolution des chancres. On va ainsi établir une statistique donnant, en fonction du temps, les fréquences des évènements suivants : régression de la lésion, aggravation ou mort de l'organe.

2°) -de mettre en relation les fréquences observées de chacune des classes d'évolution avec celles que l'on peut calculer, dans chacune des hypothèses et d'après les paramètres observés sur les chancres.

La comparaison va permettre de juger de la validité du réseau d'hypothèses. Si aucune hypothèse ne permet de rendre compte des résultats observés, nous devons conclure qu'il n'y a pas de relation entre la cicatrisation observée et la proximité des lésions cicatricielles, en d'autres termes que l'hypovirulence ne se dissémine pas.

Ensuite, il faudra faire la part du traitement des chancres dans ce phénomène, c'est-à-dire évaluer la participation des chancres traités au flux reçu; si aucune hypothèse ne permet de le montrer, nous devons en conclure que l'application de la lutte biologique a été inefficace pour accélérer la généralisation spontanée de l'hypovirulence.

Un problème se pose donc : celui d'évaluer le comportement des lésions.

LA NOTATION DES CHANCRES

=====

La fixation d'un système de notation de l'état cicatriciel est une double nécessité : pour calculer le flux émis et pour juger de l'état d'évolution observé.

Un système de notation cohérent doit être tel que, au cours du temps, les chancres qui se voient attribuer des notes satisfaisantes soient ceux qui, d'année en année voient leur note s'améliorer systématiquement, et que les mal notés soient ceux pour lesquels l'amélioration est la plus lente ou qui aient des chances non négligeables d'entraîner la mortalité de l'organe attaqué.

Pour réduire les ambiguïtés du système de notation visuel et subjectif, nous avons institué une procédure de notation complexe. Pour chaque chancre, depuis 1979, nous opérons ainsi (figure 44) :

1° - nous distinguons deux parties selon la couleur de l'écorce: partie rouge (évolutive) et noire (involutive), nous évaluons les proportions en surface de chacune.

- 2° pour chaque partie, nous notons les paramètres suivants :
- présence et importance des fentes longitudinales (2 classes)
 - profondeur du mycelium (3 classes)
 - dépression par collapsus à la marge (2 classes)
 - présence d'une écorce de néoformation (2 classes)

A ces données s'ajoutent : des observations sur l'état physiologique des branches atteintes et des prélèvements d'écorce, afin de déterminer la nature du thalle (virulent ou non).

La comparaison des données des deux notations annuelles disponibles a permis de hiérarchiser la signification des paramètres recueillis. Après avoir testé plusieurs systèmes de calcul et de pondération, celui qui a été retenu est le suivant (tableau 21).

TABLEAU 21

Coefficients de pondération pour le calcul de la note d'évaluation

	Partie noire (involutive)			Partie rouge (évolutive)		
	Superficiel	Moyen	Profond	Superficiel	Moyen	Profond
fentes longit.	36	31	21	41	26	16
abs. de depress.	129	124	114	119	104	94
écorce nouvelle	45	40	30	50	35	25
fentes + abs.dep.	135	130	120	130	115	105
fentes + ec.nvll.	51	46	36	61	46	36
écorce nouvelle +						
abs.dépression	144	139	129	139	124	114
fentes+abs.dep.+						
écorce nouvelle	150	145	135	150	135	125

Isolations

	Isol. stériles %			Isolements B %			Isolements N %			N° prélevement de l'échantillon			Dépression en P.R.			Prof. mycé. en P.R.			Ec. nivlle. en P.R.			Fentes L. en P.N.			% de partie noire			Note vég. visuelle			Rapp. circ. tour/4			Classe de long. Ch.			Age 1° trt. par 80			Distance au sol			Diamètre organe en centimètres			N° du chancre			N° de l'arbre			N° de la parcelle		
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓						
L2001001	, 35,	, 0,	, 0	, 100,	, 0,	, 0	, 200001,	, 100,	, 0,	, 0	, 0,	, LZ	, 2,	, 0,	, A,	, A,	, 2	, 0,	, A,	, A,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,									
L2001005	, 21,	, 130,	, 0	, 70,	, 0,	, 30	, 200004,	, 70,	, 0,	, 30	, 1,	, A,	, LZ	, 1,	, A,	, LZ	, 1,	, 0,	, A,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,							
L2009036	, 11,	, 130,	, 0	, 50,	, 0,	, 50	, 200028,	, 50,	, 0,	, 50	, 2,	, A,	, LZ	, 2,	, A,	, LZ	, 2,	, 0,	, A,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,						
L2002003	, 12,	, 110,	, 0	, 50,	, 50,	, 0	, 200007,	, 50,	, 50,	, 0	, 2,	, A,	, LZ	, 2,	, A,	, LZ	, 2,	, 0,	, A,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,						
L2007028	, 21,	, 0,	, 0	, 40,	, 40,	, 20	, 200022,	, 40,	, 40,	, 20	, 2,	, A,	, LZ	, 2,	, A,	, LZ	, 2,	, 0,	, A,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,						
L2007030	, 12,	, 145,	, 0	, 60,	, 0,	, 40	, 200024,	, 60,	, 0,	, 40	, 2,	, A,	, LZ	, 2,	, A,	, LZ	, 2,	, 0,	, A,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,					
L2012052	, 11,	, 0,	, 0	, 100,	, 0,	, 0	, 200040,	, 100,	, 0,	, 0	, 2,	, A,	, LZ	, 2,	, A,	, LZ	, 2,	, 0,	, A,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,					
L2012054	, 13,	, 100,	, 0	, 100,	, 0,	, 0	, 200042,	, 100,	, 0,	, 0	, 1,	, A,	, LZ	, 1,	, A,	, LZ	, 1,	, 0,	, A,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,				
L2001002	, 18,	, 200,	, 0	, 20,	, 10,	, 70	, 200002,	, 20,	, 10,	, 70	, 1,	, 0,	, LZ	, 1,	, 0,	, LZ	, 1,	, 0,	, A,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,				
L2006023	, 15,	, 150,	, 0	, 90,	, 0,	, 10	, 200021,	, 90,	, 0,	, 10	, 2,	, 0,	, LZ	, 2,	, 0,	, LZ	, 2,	, 0,	, A,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,				
L2009040	, 15,	, 115,	, 0	, 100,	, 0,	, 0	, 200031,	, 100,	, 0,	, 0	, 2,	, 0,	, LZ	, 2,	, 0,	, LZ	, 2,	, 0,	, A,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,			
L2011044	, 10,	, 150,	, 0	, 100,	, 0,	, 0	, 200035,	, 100,	, 0,	, 0	, 2,	, A,	, LZ	, 2,	, A,	, LZ	, 2,	, 0,	, A,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,			
L2008032	, 7,	, 0,	, 0	, 100,	, 0,	, 0	, 200025,	, 100,	, 0,	, 0	, 1,	, A,	, LZ	, 1,	, A,	, LZ	, 1,	, 0,	, A,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,			
L2003014	, 11,	, 0,	, 0	, 100,	, 0,	, 0	, 200013,	, 100,	, 0,	, 0	, 2,	, A,	, LZ	, 2,	, A,	, LZ	, 2,	, 0,	, A,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,			
L2003012	, 15,	, 0,	, 0	, 100,	, 0,	, 0	, 200011,	, 100,	, 0,	, 0	, 1,	, A,	, LZ	, 1,	, A,	, LZ	, 1,	, 0,	, A,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,		
L2005019	, 16,	, 60,	, 0	, 0,	, 100,	, 0	, 200017,	, 0,	, 100,	, 0	, 1,	, A,	, LZ	, 1,	, A,	, LZ	, 1,	, 0,	, A,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,		
L2003011	, 10,	, 155,	, 0	, 0,	, 50,	, 50	, 200010,	, 0,	, 50,	, 50	, 1,	, A,	, LZ	, 1,	, A,	, LZ	, 1,	, 0,	, A,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,		
L2011048	, 10,	, 190,	, 0	, 0,	, 70,	, 30	, 200036,	, 0,	, 70,	, 30	, 1,	, A,	, LZ	, 1,	, A,	, LZ	, 1,	, 0,	, A,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,		
L2009035	, 13,	, 45,	, 0	, 100,	, 0,	, 0	, 200027,	, 100,	, 0,	, 0	, 1,	, A,	, LZ	, 1,	, A,	, LZ	, 1,	, 0,	, A,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	
L2009033	, 4,	, 155,	, 0	, 0,	, 100,	, 0	, 200026,	, 0,	, 100,	, 0	, 1,	, A,	, LZ	, 1,	, A,	, LZ	, 1,	, 0,	, A,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,		
L2012049	, 11,	, 110,	, 0	, 100,	, 0,	, 0	, 200037,	, 100,	, 0,	, 0	, 1,	, A,	, LZ	, 1,	, A,	, LZ	, 1,	, 0,	, A,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,		
L2010041	, 6,	, 220,	, 0	, 100,	, 0,	, 0	, 200032,	, 100,	, 0,	, 0	, 1,	, A,	, LZ	, 1,	, A,	, LZ	, 1,	, 0,	, A,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,	, 0,		

Figure 44

Documents Informatiques de notation des chancres dans les parcelles de contrôle

Jusqu'en 1978, nous avons classé les chancres en : cicatrisé, cicatriciel, évolutif faible, évolutif fort, et létal.

Or, cette classification ne permet pas de faire une prévision de ce qui se passera les années suivantes. On constate que des lésions sont notées, par le même observateur, comme fortement évolutives pendant plus de quatre années consécutives, ce qui est contradictoire avec l'idée même d'évolution et montre bien l'inadéquation du système de notation.

En résumé, provisoirement, nous retenons de faire l'étude :

- 1/ d'un système de notation du caractère évolutif des lésions cohérent avec leur devenir.
- 2/ du pouvoir émissif des chancres, traités ou non.
- 3/ des capacités de dispersion selon diverses hypothèses.
- 4/ du champ composite en tout point de la châtaigneraie.
- 5/ du flux reçu par un chancre, connaissant sa date d'apparition.
- 6/ de la corrélation entre la notation et le comportement des chancres, d'où résultera le choix du meilleur système de notation.
- 7/ de la corrélation finale entre le flux reçu et la notation, d'où résultera une évaluation de la validité du réseau d'hypothèses ayant servi aux calculs.

ETAT ACTUEL DU TRAVAIL

=====

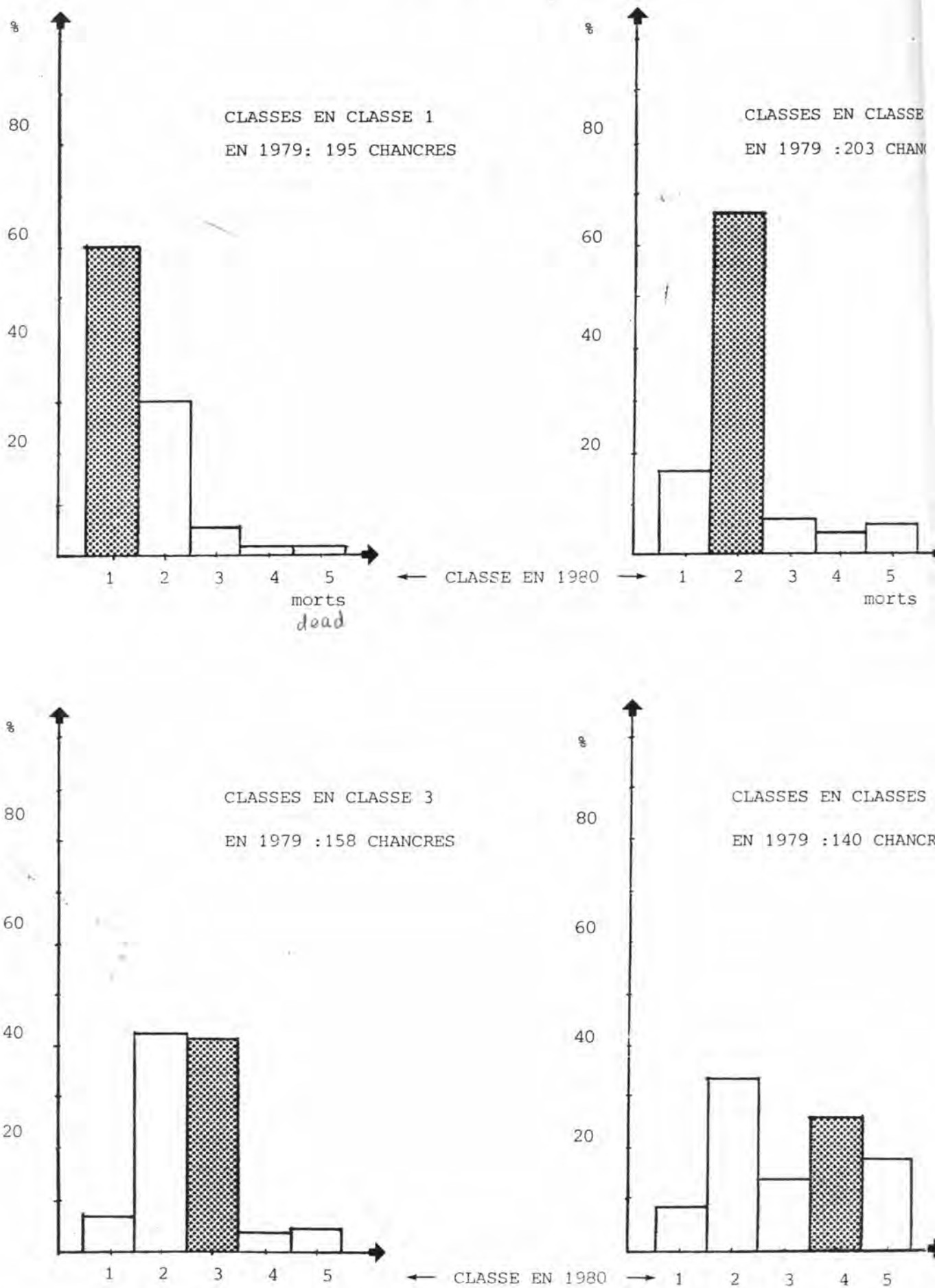
Notation des chancres

=====

Corrélation : Note - Comportement

Nous avons travaillé par approximations successives : à partir de représentations graphiques bidimensionnelles des relations entre les paramètres observés, il a été possible de déceler des tendances, donc des formules. Chaque nouvelle approximation nécessite de réexécuter les calculs sur la totalité des chancres contrôlés.

Fig. 45 : COMPORTEMENT APRES UN AN DES CHANCRES CLASSES
DANS LES QUATRE CLASSES



Systeme de calcul

Les deux nombres obtenus pour chacune des parties sont multipliés par la proportion pondérée de surface relative des deux parties, puis additionnés.

On obtient ainsi la note de comportement : NC, qui traduit l'intensité du caractère cicatriciel.

Par ce travail, nous avons établi la statistique des notes d'évolution de chacun des chancres des parcelles de contrôle. Après examen des histogrammes de répartition en classes, nous avons regroupé en 4 classes. :

- 1/ Note de 8 000 à 16 000 : cicatrisés complètement
- 2/ Note de 2 000 à 8 000 : cicatriciels
- 3/ Note de 1 000 à 2 000 : peu cicatriciels
- 4/ Note de 0 à 1 000 : semblant évolutifs.

Si l'on compare la note attribuée, selon ce système, en 1979 et en 1980, on peut constater, après regroupement en classes naturelles, que :

1/ globalement, toutes les classes tendent à évoluer vers une amélioration, ce qui reflète le fait que l'hypovirulence "gagne du terrain".

2/ les chancres bien notés (classés 1 et 2) sont ceux qui ont le moins de chances de voir leur état s'aggraver. La mortalité est très faible pour les classes 1 et 2 (1,5% pour la première et 6% pour la seconde). L'aggravation est de 13% pour l'ensemble des deux classes.

3/ la proportion d'aggravation ou de mortalité est bien plus grande pour les classes 3 et 4 en dépit du mouvement d'amélioration général : 22% de mortalité et 26% d'aggravation.

Cette première approximation est plus satisfaisante que l'ancienne note, la probabilité de cicatrisation est bien en corrélation directe avec la note attribuée. Les graphiques de la figure 37 illustrent ces résultats.

La note ainsi calculée constitue donc un moyen de prédiction statistique assez satisfaisant mais qui pourrait être encore amélioré.

Un début de réponse a donc été donné au problème d'évaluer le caractère cicatriciel d'une lésion. Une approche plus mathématique du problème est à l'étude, par les méthodes de l'analyse des données non paramétriques (partition du χ^2 , analyse discriminante).

Etude et calcul du pouvoir émissif (figure 46).

=====

Jusqu'en 1980 nous avons évalué le pouvoir émissif intrinsèque des chancres traités par l'exponentielle de l'âge du traitement.

Il est préférable de se baser sur la note : NC, qui est d'autant plus élevée que le chancre est plus cicatriciel et de tenir compte de la surface émissive : S.

On a : P.E. = Nc x S (P.E. = pouvoir émissif)

Tenant compte du fait que les chancres non traités peuvent également fonctionner comme sources émissives secondaires, nous avons admis que la note d'évolution est une bonne mesure de leur pouvoir d'émission et nous leur appliquons la même formule.

Pour une évaluation plus objective, nous effectuons actuellement des travaux d'isolement échelonnés au cours du temps, dans les différentes parties du chancre afin de mesurer l'évolution du thalle et de suivre la progression de la partie transformée.

Etude sur les capacités de dispersion

=====

Aucune étude analytique n'a été entreprise (seules des observations et des isolements furent effectués sans succès à partir de matériel ligneux transporté par les fourmis). Comme indiqué plus haut nous les supposons identiques pour tous les chancres.

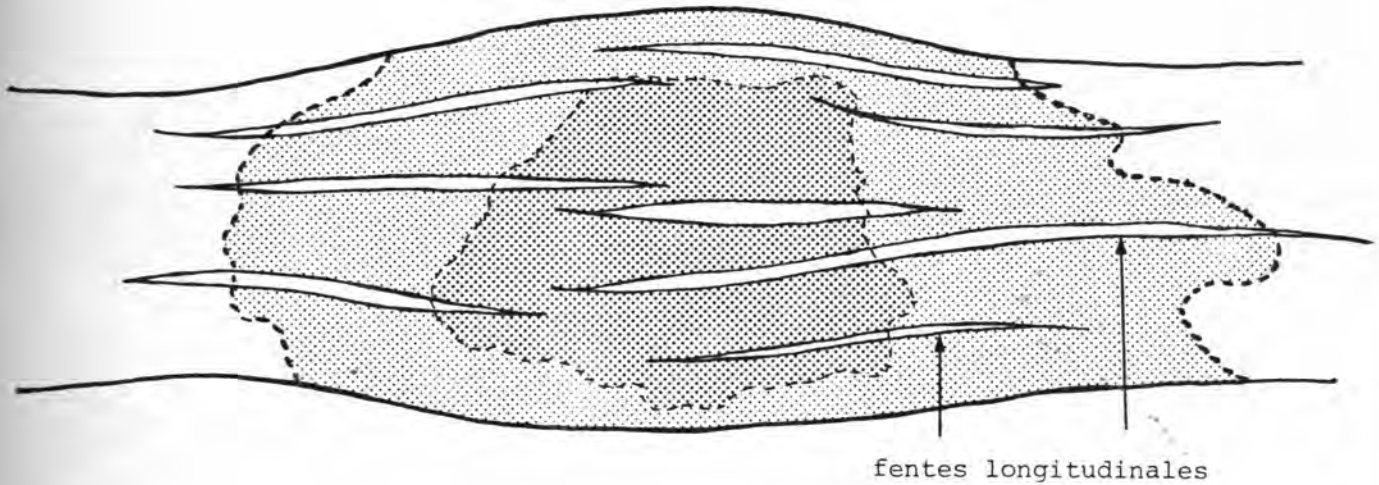
Etude du champ d'hypovirulence (figure 47).

=====

L'hypothèse la plus simple est que chaque chancre émet, par unité de surface, une quantité de germes égale et dispersée dans toutes les directions de façon uniforme; la quantité arrivant en un point est donc inversement proportionnelle au cube de la distance.

Figure 46

LA NOTION DE POUVOIR EMISSIF



- un thalle virulent -----
- a été partiellement transformé en hypovirulent -----
- des fentes longitudinales " FL " exposent aux vecteurs une surface S_e de thalle représentant X % de la surface totale S du chancre.
- si K % représente la fraction de thalle transformé :
- le pouvoir émissif sera fonction directe de : X, K, S
- par unité de surface, : $Pe = f(K \times X)$
- et pour le chancre entier, : $PE = f(K \times X \times S)$
- † on pourra prendre en première approximation : $PE = 100 \times K \times X \times S$
- K et X ne sont pas directement mesurables.

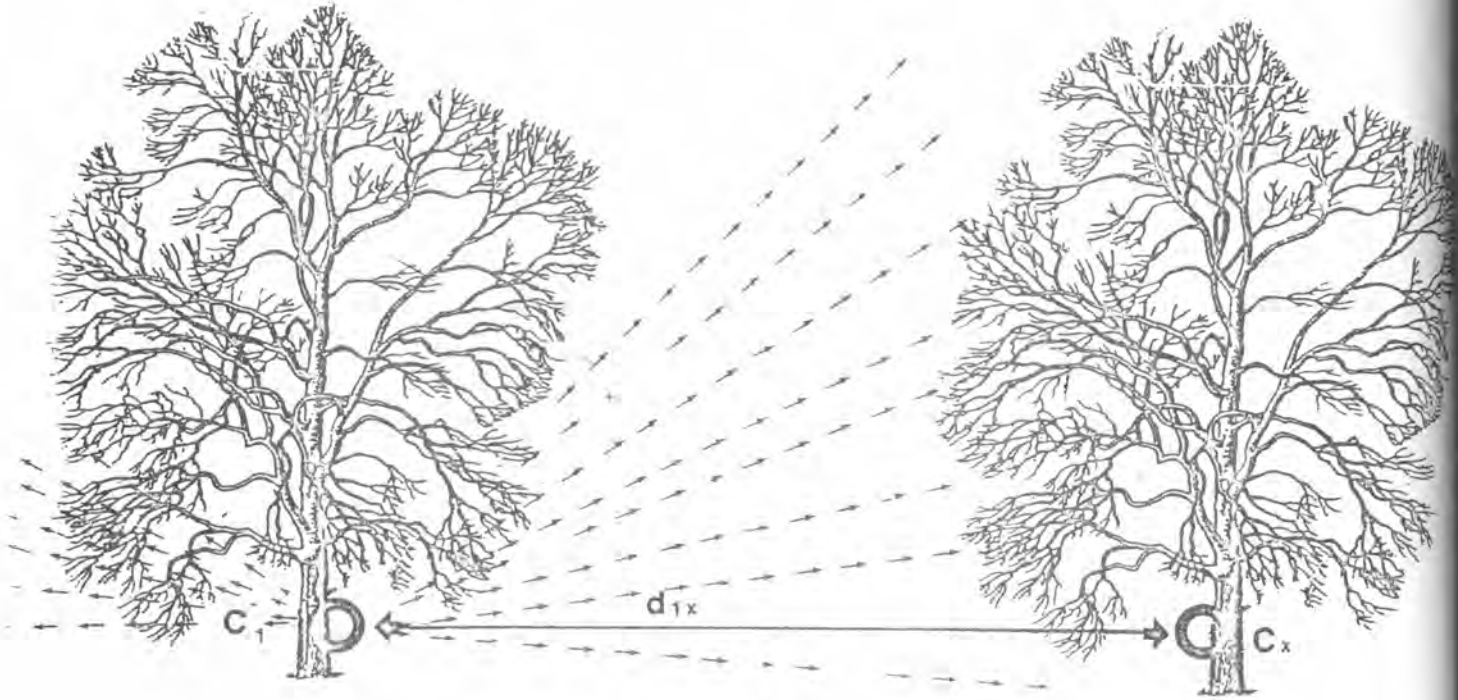
Par contre :

- la note de cicatrisation N intègre des paramètres en relation directe avec ces variables (et même, plus précis puisque la profondeur du mycelium intervient directement). On pourra considérer que la note est une bonne évaluation du pouvoir émissif par unité de surface, et écrire :

$$PE = NC \times S$$

Figure 47

LA NOTION DE CHAMP D'HYPOVIRULENCE



1/ Tout chancre abritant un thalle hypovirulent est considéré comme une source de germes d'hypovirulence disséminés par des vecteurs.

2/ Parmi les hypothèses testées, la plus cohérente s'est révélée être la dissémination dans toutes les directions de l'espace avec répartition purement aléatoire.

3/ Le chancre C1 va créer au niveau du chancre Cx un champ fonction de deux paramètres :

- a) l'intensité de l'émission : pouvoir émissif de C1
- b) la distance d_{1x} qui sépare les 2 chancres

4/ Le pouvoir émissif est fonction de la note de cicatrisation et de la surface : $PE = NC \times S$ donc $PE_1 = NC_1 \times S_1$

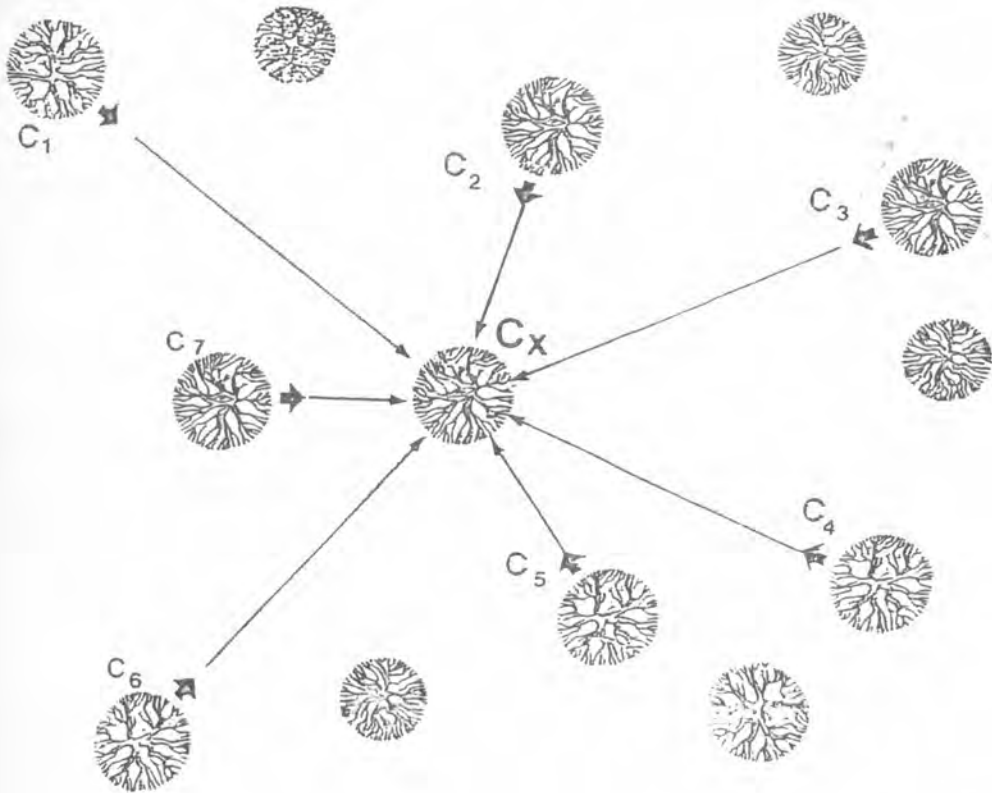
5/ Dans l'hypothèse testée de la répartition aléatoire dans l'ensemble de l'espace, le champ engendré au point Cx par C1 est :

$$C_{1x} = f(NC_1 \times S_1 \times 1/(d_{1x})^3)$$

On prendra : $C_{1x} = NC_1 \times S_1 \times 1/(d_{1x})^3$

Figure 48

LA NOTION DE CHAMP COMPOSITE



Dans une châtaigneraie : les chancre C_1 à C_7 sont à proximité d'un chancre C_x

Qu'ils soient traités ou non, chacun engendre un champ d'hypovirulence (qui peut être nul si le chancre n'est pas cicatriciel : note = 0)

Si C_{1x} est la valeur du champ créé par C_1 au niveau de C_x , on aura :

$$C_x = \sum_{i=1}^n PE_i \times 1 / (d_{ix})^3$$

Si on applique la formule : $PE = NC \times S$, on aura : $PE_i = NC_i \times S_i$

et :

$$C_x = \sum_{i=1}^n NC_i \times S_i \times 1 / (d_{ix})^3$$

Calcul du champ composite en un point (figure 48).

=====

Pour chacun des n chancres présents sur une parcelle, nous avons fait la sommation des flux reçus de chacun des n-1 chancres de son environnement, donc :

$$\text{Flux } F = \sum_{i=1}^{n-1} PE_i / D^3$$

Corrélation finale - Résultats

=====

En rapprochant la statistique des notes et des flux reçus calculés, nous pouvons établir le tableau suivant relatif à l'ensemble des parcelles traitées et non traitées, pour les notations 1979 et 1980

TABLEAU 22

Flux reçu par les différents chancres
(classification selon la note NC)

Classe et Note	Flux reçu	Nombre de chancres
Notation 1979		
1 de 8 000 à 16 000	8,35	445
2 de 2 000 à 8 000	6,66	256
3 de 1 000 à 2 000	4,66	72
4 de 0 à 1 000	2,96	9
Notation 1980		
1 de 8 000 à 16 000	13,68	680
2 de 2 000 à 8 000	11,13	205
3 de 1 000 à 2 000	8,86	51
4 de 0 à 1 000	7,00	51

La corrélation est positive et significative.

On peut conclure que plus le flux reçu est important, plus grandes sont les chances de voir les lésions évoluer vers la guérison. En d'autres termes, la proximité des lésions cicatricielles augmente les chances de guérison des chancres évolutifs. Ce fait montre bien que l'hypovirulence se dissémine par des moyens naturels à partir des chancres cicatriciels.

Reste à savoir la part prise par les chancres traités dans ce phénomène, c'est-à-dire l'utilité des traitements.

Nous avons donc étudié la notation des chancres traités dans les différentes parcelles, soit au total : 130 chancres.

En premier lieu, il est possible de remarquer que, 115 sont en classe 1, soit 88%, les deux meilleures classes regroupent 126 chancres, soit 96,9%. Ce fait illustre l'efficacité du traitement à l'échelle du chancre lui-même.

D'autre part, pour les parcelles traitées, nous avons effectué une seconde évaluation du flux reçu, en ne tenant compte que des seuls chancres traités (éliminant ainsi l'émission secondaire des chancres non traités). Il est possible de calculer le rapport de ce flux à celui évalué précédemment, ce qui donne la participation des chancres traités en pourcentage du flux total reçu.

Les valeurs trouvées sont les suivantes : tableau 23 . Elles concernent évidemment les seules parcelles traitées, si bien que le flux reçu est un peu différent de celui du tableau 22.

Mais il y a plus : si l'on considère les parcelles bien entretenues et traitées d'ARRE, de GENOLHAC et de GAN, on peut observer les résultats suivants (tableau 24)

Bien que dans ces parcelles, l'évolution de l'hypovirulence soit fort avancée, puisque les chancres de classe 4 ont disparu, on peut constater que la participation des chancres traités au flux reçu est supérieure à leur importance numérique dans le cas des flux les plus importants, c'est-à-dire pour les chancres statistiquement les mieux

cicatrisés. Ceci démontre bien que c'est au voisinage des chancres traités que la cicatrisation des non traités est la plus probable, ce qui était le but à atteindre, et que la dissémination de l'hypovirulence observée est bien la conséquence des traitements.

Enfin, dans de telles parcelles, la guérison spontanée des chancres se généralise, même aux endroits où le flux est moins important. Les chancres de catégorie évolutive ont totalement disparu; le résultat attendu est obtenu.

TABLEAU 23

Estimation de la participation des chancres traités
au flux reçu par les chancres des parcelles traitées

Pourcentage de chancres traités pour l'ensemble des parcelles :			
115 / 601 = 21,63%			

Classe	<i>range</i> Gamme de note	Flux reçu	Participation (en %) des chancres traités

Notation 1979			
1	de 8 000 à 16 000	18,29	22,92
2	de 2 000 à 8 000	16,40	24,92
3	de 1 000 à 2 000	15,41	30,31
4	de 0 à 1 000	13,47	22,77

Notation 1980			
1	de 8 000 à 16 000	13,99	18,16
2	de 2 000 à 8 000	12,20	26,97
3	de 1 000 à 2 000	9,77	43,30
4	de 0 à 1 000	7,23	26,00

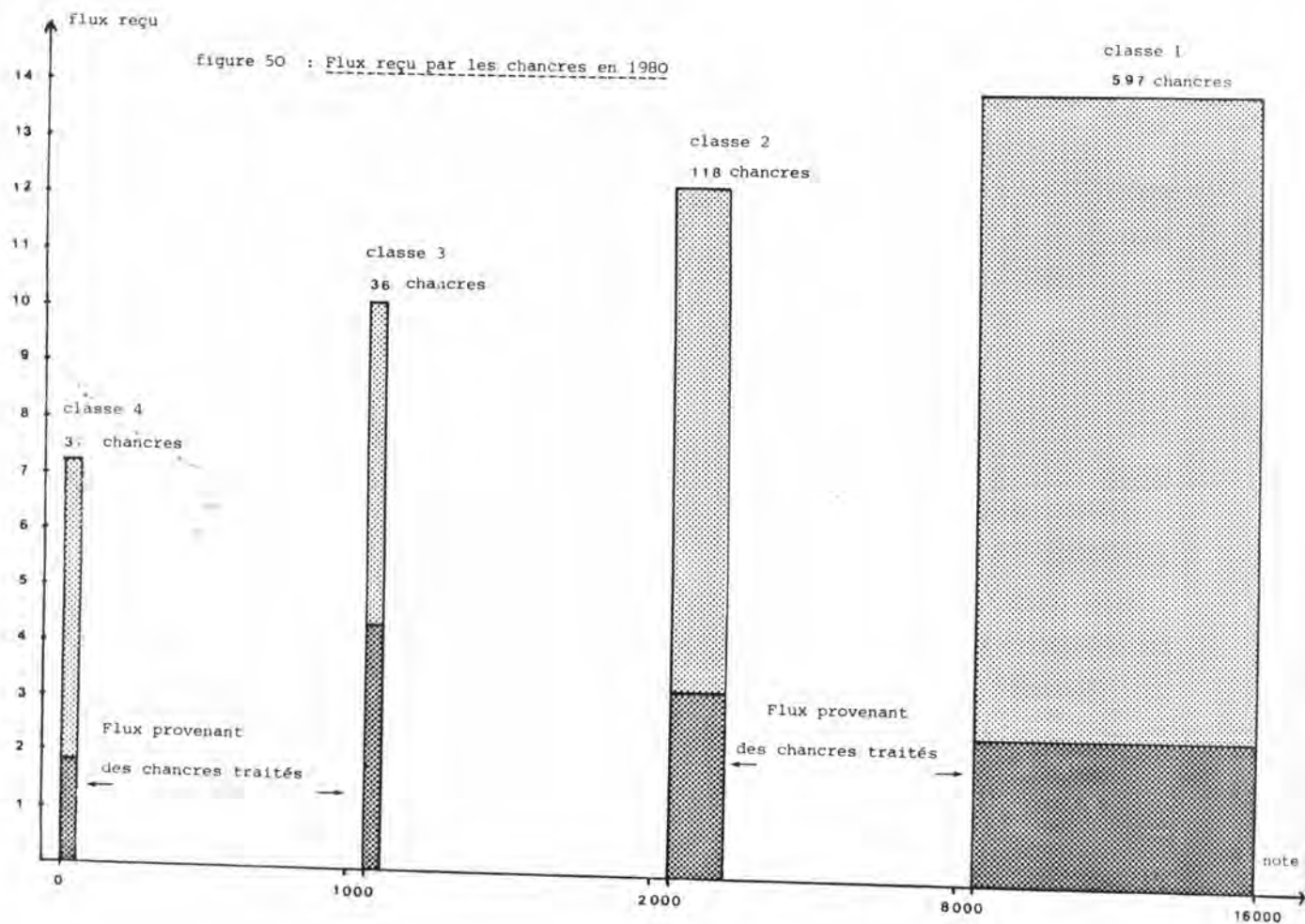
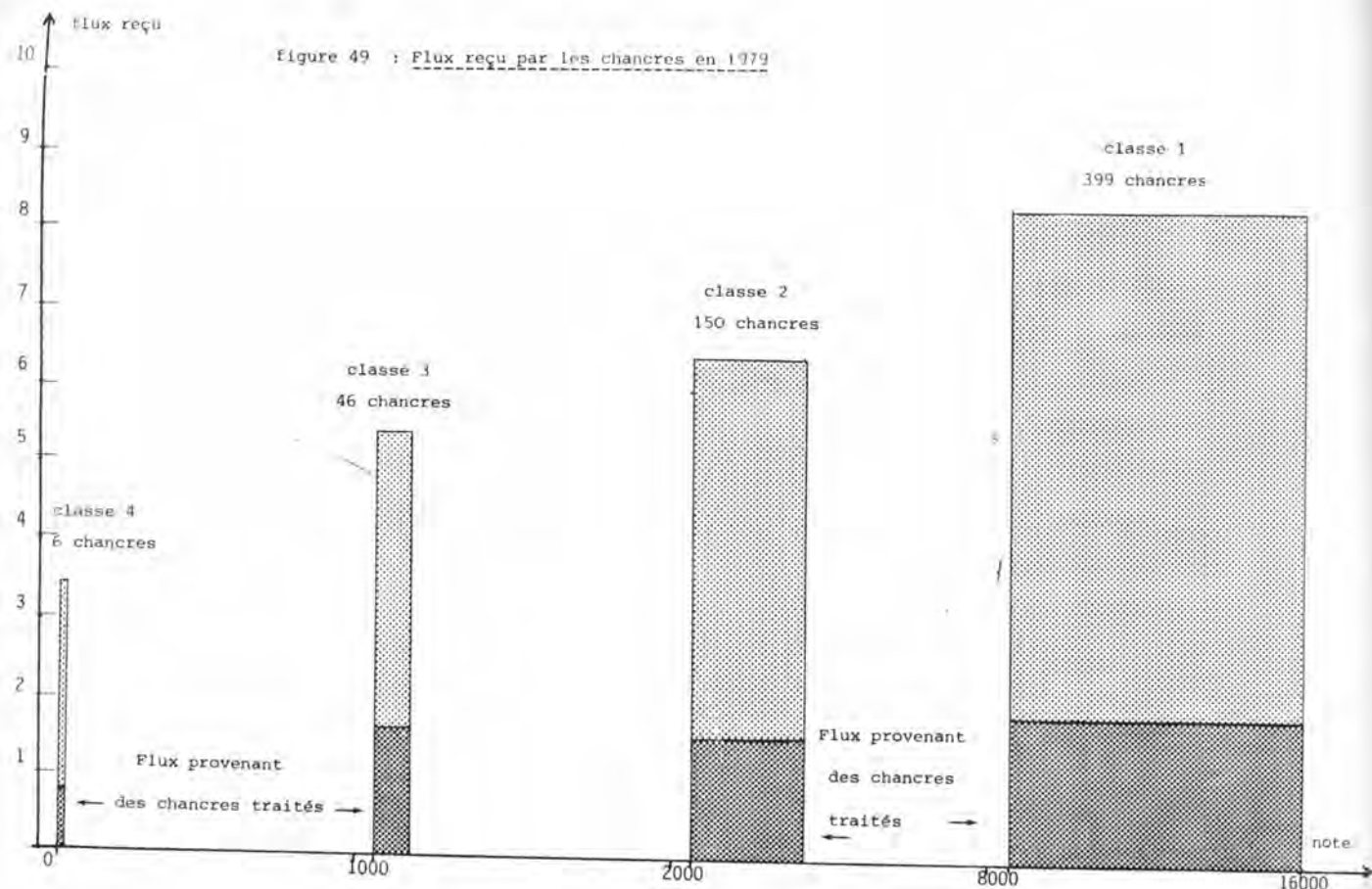
TABLEAU 24

Participation des traitements au flux dans 3 parcelles

Classe	Flux reçu	Participation des chancres traités (en %)	Observations
Parcelle d'ARRE : Pourcentage de chancres traités : 16,49%			
1	6,88	29,24	Supérieur à la proportion numérique
2	2,71	13,65	Inférieur à la proportion numérique
3	1,04	3,80	Inférieur à la proportion numérique
Parcelle de GENOLHAC : Pourcentage de chancres traités : 15,87%			
1	10,00	21,38	Supérieur à la proportion numérique
2	9,52	19,64	Supérieur à la proportion numérique
3	4,03	0,17	Inférieur à la proportion numérique
Parcelle de GAN : Pourcentage de chancres traités : 12,58%			
1	4,71	19,93	Supérieur à la proportion numérique
2	4,35	21,47	Supérieur à la proportion numérique
3	2,39	0,90	Inférieur à la proportion numérique

On constate donc que les chancres traités participent au flux reçu au-delà de leur proportion numérique, surtout pour les bonnes classes, ce qui indique bien qu'un chancre traité est, toutes choses égales par ailleurs, plus important pour la cicatrisation du voisinage qu'un chancre secondairement cicatriciel, parce que son pouvoir émissif est supérieur.

Les histogrammes des figures 49 et 50, page 176, illustrent ces résultats.



Discussion

=====

La lutte biologique a, dans la pratique, donné satisfaction en ce sens que la guérison généralisée a été observée dans les châtaigneraies traitées depuis plus de 5 ans, et particulièrement dans le massif des Maures. Les interventions annuelles restent nécessaires pour entretenir un niveau d'hypovirulence suffisant, à raison de 2 à 3 traitements par hectare.

Le problème de savoir s'il s'agit d'une épidémie d'hypovirulence spontanée ou d'un effet des introductions de souches B effectuées, aurait nécessité de conserver des châtaigneraies témoins, en tout point comparables aux traitées, très éloignées des zones d'introduction, ce qui était pratiquement impossible. Ajoutons que dès le début de l'application il était évident qu'une épidémie spontanée d'hypovirulence se développait (isolement de quelques rares souches sauvages). Le problème est donc déplacé et consiste à savoir si les interventions ont accéléré la dissémination des souches B.

La corrélation entre la probabilité de guérison et le flux d'hypovirulence apporte une réponse positive : la guérison est plus probable au voisinage des chancres cicatriciels; le traitement créant de tels types de lésion, il ne peut que concourir au résultat recherché; la participation des chancres traités au flux confirme cette conclusion.

Il serait intéressant de connaître, d'une part la nature exacte des propagules qui disséminent la maladie et l'hypovirulence, ainsi que les vecteurs qui les transportent. Peter DAY (1978) a fait une analyse objective du problème et trace la voie pour les recherches nécessaires. Il est certain qu'une meilleure connaissance de la nature exacte de l'hypovirulence (très vraisemblablement virale) serait une aide précieuse pour progresser dans cette voie.

Une connaissance de l'épidémiologie de l'Endothia au niveau mathématique constituerait un outil précieux, une approche a été fournie par G. BAZZIGHER (1964); elle sera utilisée dans nos futures études.

DISCUSSION GENERALE

Nous avons présenté le châtaignier comme un élément essentiel de l'équilibre agro-sylvo-pastoral des régions de demi-montagne (en sol non calcaire); certaines tendances de l'aménagement du territoire souhaitent son remplacement par des essences résineuses qui, si elles ne peuvent assurer un revenu annuel à l'exploitant, ont le mérite de nécessiter moins de soins avec un revenu final assez rémunérateur du capital investi.

Les deux conceptions peuvent se défendre; pour notre part nous préférons le châtaignier, parce que nous ne sommes pas certains que les villes absorberont toute la population des régions de montagne qui ne vit pas de l'exploitation de la forêt résineuse et qu'il faudra bien maintenir une population agricole sur place, ne serait-ce que pour l'entretien de l'environnement.

Dans les particularités biologiques du châtaignier, nous avons insisté sur ses facultés de régénération et quelque peu négligé l'impact de la maladie de l'Encre qui tue chaque année de nombreux arbres, et ce de façon définitive. Les recherches que nous avons effectuées sur cette maladie nous ont appris qu'elle ne sévit que dans les sols humides et que son évolution à long terme passe par des périodes de crises et de rémissions très longues; elle ne nous semble pas mettre la castanéiculture en réel danger mais il est évident que, en présence de la maladie de l'Encre, la lutte contre l'Endothia est vaine : l'arbre ne peut plus faire jouer ses mécanismes de défense naturelle.

La description des relations hôte-parasite que nous avons présentée montre que les connaissances des phénomènes à l'échelon cellulaire et biochimique sont rudimentaires dans le cas du couple châtaignier-Endothia; les mécanismes connus dans d'autres cas mieux étudiés sont-ils les mêmes? Nous ne pouvons répondre. Il serait pourtant utile de mieux connaître les moyens de reconnaissance plante-champignon, ne serait-ce que pour savoir pourquoi l'Endothia n'attaque pas les organes souterrains.

La résistance spécifique du C.mollissima, la semi-résistance du C.crenata nous semblent différer très notablement. D'après d'anciens

travaux de test, le C.mollissima nous semblait doué d'une résistance inconditionnelle, par contre, celle de C.crenata liée au milieu. La première proposition devrait être revue, mais surtout les mécanismes gagneraient à être élucidés. Etudiant le comportement de 10 000 types divers (dont des hybrides complexes), nous avons (GREUTE et SAURET 1960) établi que deux "mécanismes généraux" interviennent dans la résistance du châtaignier à l'Endothia : 1/ le ralentissement du développement de la lésion (inconditionnel et contrôlé par les gènes de C.mollissima) et 2/ la vitesse de formation des barrières réactionnelles (conditionnée par le milieu et contrôlée par le génome C.sativa et C.crenata). Des connaissances plus approfondies permettraient non seulement de réaliser une meilleure adaptation au milieu, ou même de le modifier (fertilisation), mais aussi de comprendre les relations avec la résistance ontogénique.

Cette dernière notion aurait dû être prise en considération lors de premières prospections en Italie. Si nous avions noté le diamètre des organes atteints, nous aurions pu, peut-être, expliquer certaines des discordances observées dans le caractère cicatriciel des chancres et les résultats des isolements (échec d'isolement de B à partir de lésions cicatricielles); notons également que l'appréciation du caractère évolutif/cicatriciel était, à cette époque, entièrement subjectif.

Nous avons, au chapitre II, établi la corrélation entre la cicatrization et la possibilité d'isoler des types B; nous avons ensuite établi l'hypovirulence de B; nos premières conclusions étaient fondées sur la virulence des types N. Or, nous avons pu constater qu'à partir de 1974 étaient apparues des N hypovirulentes. Les conclusions des premières études restent-elles valides? Oui, si nous considérons que nous avons effectué des expériences comparatives (protection, exclusion, anastomose in-vitro et in-vivo) avec des N virulentes et que l'apparition des N hypovirulentes est postérieure aux expériences. Existait-il en Italie des souches N hypovirulentes en 1964-65? Nous pouvons seulement affirmer que celles que nous avons isolées et testées étaient virulentes; s'il existait des N hypovirulentes, nous pourrions expliquer les échecs d'isolements de B depuis des chancres cicatriciels; ce serait un apport de plus mais aucunement une remise en cause des premières conclusions.

Nous pourrions nous poser une autre question : est-il apparu depuis 1964 des N hypovirulentes en Italie? Nous ne pouvons répondre actuellement mais nous en avons les moyens; en effet, PALENZONA a isolé (1977 à 1978) près d'un millier de souches au cours d'une étude d'épidémiologie et elles figurent dans notre mycothèque, il nous reste à les tester.

Un autre problème est de savoir si l'hypovirulence des N a les mêmes caractères de transmissibilité que celle des B. Ne pas pouvoir actuellement répondre à cette question constitue une lacune importante de notre travail qui sera comblée dans l'avenir (thème prioritaire des futures recherches).

L'hypovirulence des souches B est considérée comme un caractère global. Entre souches B existent pourtant des différences dans "l'intensité" de cette hypovirulence, mesurée par la vitesse d'évolution des lésions. Si la gamme de virulence se révélait continue depuis la virulence des N jusqu'à l'hypovirulence totale des premières souches B isolées, le problème serait de savoir où fixer la frontière entre les deux catégories : certainement au point de rupture où l'on obtient des lésions évolutives ou cicatricielles, ce qui n'est pas facile à décider de façon radicale (influence des conditions physiologiques). Actuellement, cette continuité n'existe pas encore mais le problème pourrait bien se poser dans l'avenir.

D'autres différences pourraient être trouvées entre les B : nous avons commencé un travail de mesure de la vitesse d'invasion du thalle virulent par l'hypovirulence à la suite de l'anastomose; des difficultés rencontrées ne nous ont pas permis de le poursuivre plus avant. Il n'y a aucune raison pour que les déterminants de l'hypovirulence soient identiques dans toutes les souches. Si l'on se réfère aux travaux de l'équipe de P.DAY sur les ARN bicaténaires, il y en aurait plusieurs catégories (identifiées par leur poids moléculaire) avec des modalités de transmission aberrante; si l'on admettait que les déterminants anormaux représentent des mutations de leurs homologues normaux, la variation apparaîtrait comme tout à fait prévisible. Notre ignorance de la nature exacte de l'hypovirulence empêche une vue claire des modalités de ses manifestations et de sa transmission.

La seule étude des descendance monospores ne peut suffire à nous éclairer. Nous n'avons pas relaté les travaux de thermothérapie qui ont toujours échoué dans notre laboratoire, alors qu'à la faculté de Botanique de Clermont-Ferrand, BELAN a réussi à obtenir une forme N à partir de la B 2025; nous avons testé sa virulence et constaté qu'elle avait bien été restaurée. Certaines cultures de 2025 semblent suspectes : l'équipe de P. DAY la considère comme virulente alors que le laboratoire du C.N.I.C.M. en possède un exemplaire hypovirulent utilisé dans la lutte.

Le problème reste donc entier.

Nos premières hypothèses étaient relatives à une mutation mitochondriale, aussi avons-nous testé l'action de mutagènes réputés spécifiques (orangé d'acridine, acriflavines etc..), avec des résultats négatifs. L'action d'autres agents mutagènes (radiations ultra-violettes, nitrosoguanidine) ne nous ont donné que des mutants de morphologie B, hypovirulents mais non infectieux (ainsi que des auxotrophes). Nous devons remarquer que la fréquence des mutants obtenus est très faible, ce qui nous porte à penser que les substances pénètrent difficilement dans le protoplasme (probablement en raison des particularités pariétales du champignon). Nous pensons qu'il serait bon de tenter ce travail sur des protoplastes.

Les mécanismes d'action de l'hypovirulence dans l'interaction hôte-parasite restent obscurs. S'agit-il d'une diminution des capacités d'invasion du champignon ou d'une induction, chez la plante, de capacités accrues de résistance? Des travaux sur la production de toxine (diaporthine) montrent, in-vivo, des différences difficilement interprétables. Selon nos observations, la toxine brute ralentirait l'apparition de barrières subérisées mais nous sommes incapables de préciser si l'action s'exerce au niveau de la différenciation d'une assise génératrice suberophellodermique ou de la subérisation ultérieure des cellules. Le fractionnement de la toxine brute (travail de LAPLACE) va peut-être permettre de reprendre cette étude sur de meilleures bases.

De récents travaux italiens pourraient donner corps à l'hypothèse sur l'induction chez la plante de substances de résistance (phytoalexines) sous l'action des souches hypovirulentes.

Nous ne reviendrons pas sur les insuffisances des modèles avancés sur le déterminisme de l'hypovirulence, les ayant soulignés au chapitre IV; les preuves que nous avançons sur sa nature extrachromosomique ne sont pas entièrement convaincantes : le test heterocaryon à partir de mutants auxotrophes n'est pas entièrement conforme aux normes habituelles; si la stabilité du caractère a bien été éprouvée, sa nature exacte n'a pas été établie, de plus le test n'a pas été effectué sur une gamme assez large de mutants et l'étude du comportement des souches issues des anastomoses entre auxotrophes et prototrophes virulents et hypovirulents n'a pas été poursuivie, l'ensemble des faits laisse cependant peu de place pour d'autres interprétations.

La caryologie des pycnospores n'est peut-être pas assez précise pour une conclusion définitive; les spores des N sont certes uninucléées et nous n'avons détecté qu'un seul noyau bien identifiable dans celles des B, mais dans ces dernières, semble exister une inclusion (ne prenant pas la coloration à l'hématoxyline) non détectée chez les N. Une étude ultrastructurale serait du plus grand intérêt. Nous soulignerons cependant la cohérence du modèle proposé avec les résultats des confrontations.

Dans les expériences de confrontation in-vitro, la possibilité de recouvrement du thalle B par le N est une interprétation que nous avons écartée sur la base d'observations (vitesse de croissance relative des deux thalles) et de travaux utilisant les mutants marqués; ces arguments pourraient paraître insuffisants si la compatibilité pour la transmission de l'hypovirulence ne venait montrer que la souche N est "transformée".

Les expériences qui entravent ou ralentissent le contact entre les thalles tendent à prouver le rôle des anastomoses dans la modification observée; les observations microscopiques sont complètement cohérentes avec l'interprétation proposée.

Il serait intéressant de savoir pourquoi la modification ne concerne pas les pycnides mais seulement les filaments indifférenciés; nous attribuons cette particularité à l'obturation des pores des septa dans les hyphes situés à la base des pycnides, nos observations microscopiques à ce sujet sont à étoffer.

Les expériences de protection et d'exclusion ont été le point de départ pour la conception de la méthode de lutte, on pourrait se demander si la résistance ontogénique n'est pas venue perturber le résultat et conduire à des interprétations erronées; les expériences étant comparatives et l'inoculation des souches N ayant provoqué la mort de l'organe dans les témoins, nous devons rejeter cette hypothèse. Les expériences d'exclusions ont été répétées au cours de la lutte biologique à plusieurs dizaines de milliers d'exemplaires, il n'est plus question pour nous de les mettre en doute dans leurs résultats immédiats (arrêt de développement du chancre); mais la grande difficulté est qu'on ne réisole pas toujours la souche B inoculée. Certes, l'apparition de N hypovirulentes est de nature à donner une explication acceptable mais de nombreux travaux sont nécessaires pour en préciser la fréquence et le rôle dans l'épidémiologie.

De la compatibilité pour la transmission de l'hypovirulence, nous avons présenté des résultats parfaitement concordants avec les diverses interprétations précédentes. La compatibilité est pourtant sujette à des variations; les expériences donnent statistiquement des résultats concordants mais il est nécessaire de disposer de nombreuses répétitions car, curieusement, certaines combinaisons compatibles donnent parfois des résultats négatifs. Ceci est prévisible quand il s'agit de compatibilités aléatoires, mais pas pour des compatibilités régulières entre souches possédant le même équipement nucléaire (accident relativement rare heureusement).

L'obtention de souches nouvelles par les "anastomoses forcées" in-vitro et in-vivo est un prolongement des études sur la compatibilité. S. ANAGNOSTAKIS utilise, pour le test de la virulence des souches et pour celui de la compatibilité, l'inoculation de tiges de châtaignier maintenues en survie; elle borne ses observations à quelques semaines et obtient cependant des résultats très significatifs, qui montrent bien la transformation du thalle in situ; elle est même capable de détecter des modalités de virulence (types de virulence que nous avons dénommés "américains").

Nous avons utilisé cette méthode pour un test préalable de la virulence avec des résultats assez satisfaisants mais nous ne le considérons pas comme suffisamment fiable pour éprouver le pouvoir d'exclusion, c'est-à-dire la compatibilité in-vivo; le reproche essentiel que nous pouvons faire à ce procédé est que les barrières de liège ne peuvent se former exactement comme sur la plante vivante. En dépit de ces critiques, nous avons utilisé la méthode avec succès pour des "anastomoses forcées in-vivo".

Les résultats de la comparaison entre les deux systèmes de compatibilité : celui que nous utilisons et qui éprouve la capacité de transmission de l'hypovirulence in-vitro, et celui de S.ANAGNOSTAKIS qui définit des "VC.groups", donne lieu à des conclusions relativement claires à l'issue desquelles nous concluons à la possibilité de transmission hétérogroupe, cohérente avec les observations microscopiques effectuées. Il n'en reste pas moins que la compatibilité inter-groupes est irrégulièrement répartie entre souches appartenant à un même groupe; on ne peut s'empêcher de penser soit que la détermination des "VC.groups" peut être entachée d'erreurs, soit que ce concept ne recouvre pas des entités aussi homologues que prévu. Nous nous trouvons devant des problèmes de reconnaissance cellulaire, de compatibilité des mélanges de cytoplasmes, et nous savons que le déterminisme en est fort complexe. Il reste que l'idée d'utiliser les "VC.groups" pour la sélection de souches utilisables en lutte biologique se révèle praticable théoriquement, puisque la compatibilité isogroupe est assurée; mais en pratique, elle conduirait à l'utilisation d'une gamme de 64 souches hypovirulentes, au moins. Si nous réussissons à protéger la châtaigneraie française avec 10 souches hypovirulentes, c'est à coup sûr parce que les "VC.groups" sont moins nombreux qu'aux U.S.A. mais aussi parce que nous faisons jouer la compatibilité hétérogroupe.

Enfin, nous soulignerons que la technique des inoculums en pâtes et les mélanges qu'elle permet a enlevé beaucoup de l'impact pratique à la sélection des souches compatibles.

En ce qui concerne la pratique de la lutte biologique, nous n'avons pas pensé utile de rapporter les travaux effectués pour résoudre les problèmes de production d'inoculum en grande quantité. L'utilisation

d'inoculum en pellets est un procédé développé pour les besoins de l'épreuve de la résistance; on peut s'étonner de nous voir l'adopter pour les expériences de protection et d'exclusion. Notre idée était que les souches hypovirulentes ayant intrinsèquement peu de chances de s'établir dans les tissus de la plante, il était contre-indiqué d'utiliser une méthode d'inoculation peu fiable : il faut en effet que le thalle hypovirulent puisse rencontrer les hyphes du thalle N dans les tissus). Il est possible de s'étonner que les broyats de mycelium utilisés dans la technique des pâtes aient une aussi bonne efficacité; nous ne pouvons pas proposer d'explication mais seulement souligner la similitude avec le Phytophthora cinnamomi, pour lequel nous avons, avant 1960, développé une technique identique.

Le principe de la lutte biologique est d'implanter des souches hypovirulentes dans les châtaigneraies pour accélérer la dissémination. Cette idée a soulevé bien des oppositions de la part de différents techniciens.

D'abord, il nous a été opposé que les souches hypovirulentes, fructifiant peu ou pas, ne pouvaient pas être disséminées. C'est là une double méprise :

1/ les capacités de sporulation sont certes faibles dans les conditions du laboratoire et, dans l'équipe de Peter DAY, J. ELLISTON a observé le même phénomène in-vivo dans les châtaigneraies. Mais pour ce qui est des souches françaises et dans les conditions de notre pays, la même conclusion vaut pour les souches normales; la fructification a lieu sur les vieilles écorces ou sur les parties mortes depuis longtemps; nous avons observé aussi une très grande variation à cet égard sans être capable de l'expliquer ni de la rattacher à aucun facteur du milieu ou de souche.

2/ les pycnospores jouent dans la dissémination de la maladie un rôle négligeable; cette affirmation résulte d'expériences nombreuses et répétées annuellement depuis 1958 selon de très nombreuses modalités : la réussite n'a jamais dépassé quelques pourcents.

L'existence de N hypovirulentes à fructification abondante vient apporter un élément nouveau. De toutes façons, l'ubiquité des souches hypovirulentes en Italie et dans les zones traitées depuis 1965-67 en

France, ne peut s'expliquer que, soit par une transformation spontanée des souches N en tout point de la châtaigneraie -hypothèse peu vraisemblable, soit par la dissémination à partir d'un point d'apparition, ce qui est en accord avec les observations épidémiologiques de PALENZONA (1) et les résultats de notre étude.

L'étude épidémiologique que nous présentons est encore très rudimentaire, elle repose sur tout un réseau d'hypothèses imbriquées, sur des approximations, des postulats et des a-priori. Le mode de culture du châtaignier n'est guère favorable à l'établissement d'un dispositif expérimental à l'abri des critiques, le problème est d'autant plus ardu qu'il n'a pas été résolu de façon définitive pour les espèces ligneuses cultivées en verger, même à partir d'un matériel végétal homogène. De plus, même avec un dispositif incontesté et un matériel végétal homogène, on aurait de grandes difficultés à éliminer l'effet de l'hétérogénéité du milieu (dans l'espace et dans le temps). Les moyens pour mettre en place un bon dispositif sont hors de proportion avec ceux dont nous disposons.

La méthodologie provisoire n'a pas la prétention d'apporter une réponse incontestable au problème; si nous avons pu montrer par des calculs la réalité de ce qui peut être observé sur le terrain, il ne faut surtout pas en conclure à l'inutilité de l'épidémiologie qui doit nous permettre d'affiner la stratégie de l'application. Nous en donnerons un seul exemple :

Dans les régions nouvellement atteintes, les chancres sont peu nombreux. Comment dès lors protéger les arbres encore sains? Si tous les chancres étaient accessibles, on les traiterait tous, mais ce n'est pas le cas. De toutes façons, cette action suffirait-elle pour créer un champ d'hypovirulence efficace contre l'arrivée de souches virulentes? Une étude rigoureuse d'épidémiologie pourrait nous fixer sur la densité des introductions à réaliser, sur la planification du traitement.

(1) Rapport non publié au Gouvernement provincial de TORINO.

Nous soulignerons également que, dans nos calculs, il a été seulement tenu compte du flux de ce que nous avons appelé "germes d'hypovirulence", alors qu'il existe aussi un flux de germes virulents. Nous supposons que seul le premier est significatif, en d'autres termes que le contact d'un thalle virulent avec un germe hypovirulent donne un résultat qui ne dépend pas de la présence de germes virulents dans le milieu; c'est, somme toute, une généralisation de la notion de protection qui nous semble justifiée.

L'étude épidémiologique est poursuivie actuellement en utilisant les moyens modernes d'analyse des données, mais avec la difficulté qu'il n'est pas possible de revenir en arrière et que les seuls paramètres dont nous disposons sont ceux que nous avons recueillis, bons ou mauvais, et qu'il restera peu d'années pour collecter des données mieux adaptées.

CONCLUSIONS GENERALES

La guérison spontanée d'une des plus graves maladies ayant jamais affecté une espèce ligneuse : le chancre du châtaignier dû à l'Endothia parasitica, est un phénomène original qui méritait une étude systématique. Si l'arbre n'occupe pas une place de choix dans l'économie agricole, son rôle écologique et social s'ajoute à l'intérêt spéculatif du phénomène.

Un premier fait important est que la plante possède naturellement des mécanismes de défense, malheureusement inefficaces contre les formes normalement virulentes du parasite.

Un second fait est l'apparition de "souches" anormales du champignon parasite, dénommées "hypovirulentes", qui ne sont plus capables de déborder les barrières de réaction de l'arbre.

Le troisième fait est la nature contagieuse du caractère d'hypovirulence.

L'étude de l'évolution de l'épidémie en Italie a permis successivement :

- 1/ de confirmer les observations de BIRAGHI concernant la cicatrisation spontanée des lésions et ses modalités.
- 2/ de mettre en évidence des formes nouvelles de l'Endothia parasitica, caractérisées par une morphologie particulièrement remarquable. Les souches "B" du parasite, incapables de différencier leurs organes de reproduction asexuée en conditions standard de culture, sont associées à la guérison dans une corrélation statistique positive et significative.

La relation de cause à effet entre les deux phénomènes a été prouvée par :

- a) l'étude comparée des propriétés pathogènes des deux formes du parasite qui nous a conduit à définir une notion nouvelle :

celle de "l'hypovirulence", perte partielle (et non totale comme le serait "l'avirulence") des capacités d'infection du pathogène.

b) l'étude des interactions in-vivo entre les deux types qui ont conduit à la notion de "protection" puis à celle d'"exclusion". Ces propriétés montrent que les formes hypovirulentes sont capables par leur présence d'inhiber les manifestations de la forme virulente ou même de la faire régresser si elle était préétablie dans la plante.

Ces propriétés permettent de conclure que la corrélation observée n'était pas fortuite mais que les souches B avaient bien provoqué la guérison des chancres.

La nature même du phénomène et sa généralisation à l'ensemble de la châtaigneraie impliquaient que les souches B possèdent des propriétés spéciales, de nature à expliquer qu'une forme inadaptée à la vie parasitaire et ne possédant pas une meilleure adaptation à la vie en saprophyte, puisse prédominer aux dépens de leur homologue normal.

Cette propriété fut trouvée dans la nature infectieuse de l'hypovirulence. Les expériences de confrontation in-vitro ont amené à la conclusion que la morphologie B était transmise d'un thalle B à un thalle N, entraînant sa transformation (au sens commun du terme) en B. Les réisolements effectués à partir des expériences de protection et d'exclusion conduisaient à la conclusion que la transformation pouvait avoir lieu sur l'hôte comme au laboratoire. La cohérence des faits expérimentaux avec les observations permet de concevoir une méthode de lutte pratique par utilisation des mécanismes naturels de défense et des propriétés naturelles des souches B.

Des précisions sur les modalités de transmission de l'hypovirulence devaient être acquises : par de multiples confrontations entre souches N et B, il a été possible de mettre en évidence un système de correspondance entre souches que nous avons dénommé "compatibilité pour la transmission de l'hypovirulence". Apparue d'abord comme de nature essentiellement géographique, elle fut ensuite associée à des particularités individuelles des souches.

L'étude microscopique du comportement des anastomoses nous permet de conclure non seulement que l'anastomose est le moteur de la transmission, mais que la longévité des mélanges de cytoplasmes en conditionne les résultats.

L'étude des descendance monospores met en lumière la stabilité des souches N et la ségrégation continue des types B en trois formes : N, B et JR, cette dernière (non ségrégante par la suite) étant douée d'hypovirulence contagieuse. Combinées à des tests hétérocaryon, ces études conduisent à conclure que l'hypovirulence est très vraisemblablement déterminée par des mécanismes extranucléaires.

La compatibilité d'anastomose, liée à la transmission, a au contraire toutes chances d'être conditionnée par le noyau. Il en découle qu'en associant un noyau au déterminant de l'hypovirulence, on crée une nouvelle souche hypovirulente, c'est ce qui a lieu quand réussit une anastomose entre deux souches incompatibles ou partiellement compatibles. En effet, l'étude détaillée de la transmission montre que la compatibilité revêt trois modalités : régulière, aléatoire, inexistante; elles diffèrent entre elles par la probabilité de réussite (la troisième catégorie n'est peut-être qu'une compatibilité aléatoire à très faible probabilité). La multiplication des fronts de confrontations, in-vivo comme in-vitro (dénommée : anastomose forcée) conduit très souvent (surtout in-vivo) à la création de nouvelles souches hypovirulentes.

L'étude des résultats de la lutte biologique permet de mettre en évidence l'apparition dans les châtaigneraies de souches hypovirulentes de morphologie normale; nous en concluons que la convergence : hypovirulence/morphologie B n'était que fortuite.

Les expériences d'exclusion reconstituaient, de façon contrôlée, l'évolution de la maladie depuis la nocivité jusqu'à l'inocuité, telle qu'observée en Italie. Nous avons donc conçu une méthode de lutte biologique mettant à profit les propriétés d'hypovirulence contagieuse.

Après expérimentation, la méthode a été appliquée à l'ensemble de la châtaigneraie française.

Une étude épidémiologique a été entreprise depuis 1979 pour obtenir une confirmation précise des résultats enregistrés dans l'expérimentation. L'idée de la lutte biologique étant d'accélérer la substitution de souches hypovirulentes aux virulentes (comme observée en Italie), il était nécessaire de mettre au point une méthode de mesure du caractère cicatriciel des chancres, puis de mettre en relation la fréquence de la cicatrisation avec la proximité des lésions cicatricielles d'une part, et avec les introductions de souches hypovirulentes d'autre part.

En attendant de pouvoir mettre en place une étude statistique précise, une méthodologie provisoire a été adoptée. Les premiers résultats montrent que les chances de guérison d'un chancre sont d'autant plus élevées qu'il est plus voisin de chancres plus cicatriciels et plus nombreux. Les chancres traités sont ceux dont le caractère cicatriciel est le plus élevé; ils apparaissent nettement comme les sources essentielles de la dissémination de l'hypovirulence, ce qui est conforme aux prévisions.

BIBLIOGRAPHIE

ALAIS C. et NOVAK G., 1968 - Etude d'un enzyme coagulant microbien dérivé de Endothia parasitica. Le Lait, 48, 477, 393-418.

ANAGNOSTAKIS S., 1977 - Vegetative Incompatibility in Endothia parasitica. Experimental Mycology, 1, 306-316.

ANAGNOSTAKIS S.L., 1978 - American Experience with Hypovirulence in Endothia parasitica. American Chestnut Symposium Proc., West Virginia University, Morgantown, January 4-5, 1978, 103-105.

BALLARD G., 1979 - La lutte biologique contre le chancre à Endothia du châtaignier. Faculté des Sciences de BREST, M.S.T. appliquée aux industries agro-alimentaires, Mémoire de fin d'études, Stage effectué au laboratoire du C.N.I.C.M. Clermont-Ferrand.

BAZZIGHER G., 1953 - Beitrag zur Kenntnis der Endothia parasitica (Murr.) And. dem Erreger des Kastaniensterbens. Phytopath. Z., 21, 2, 105-132.

BAZZIGHER G., 1955 - Über Tannin- und phenolspaltende Fermente von Endothia parasitica. Phytopath. Z., 24, 3, 265-282.

BAZZIGHER G., 1957 - Tannin- und phenolspaltende Fermente dreier parasitischer Pilze. Phytopath., Z., 29, 299-304.

BAZZIGHER G., 1958 - Der Wuchsstoffbedarf Zweier phytopathogener Pilze. Phytopath. Z., 32, 352-358.

BAZZIGHER G. und P. SCHMID, 1962 - Methodik zur Prüfung der Endothia-Resistenz bei Kastanien. Phytopath. Z., 45, 2, 169-189.

- BAZZIGHER G., 1964 - Die Ausbreitung der Endothia- Seuche im Kanton Tessin. Journal forestier suisse, 115, 5.
- BIRAGHI A., 1950 - La distribuzione del cancro del castagno in Italia. Italia Forestale e Montana, Ann. 5, fasc. 1.
- BIRAGHI A., 1951 - Endothia parasitica caratteri di resistenza in Castanea sativa nei confronti di Endothia parasitica. Boll. Staz. Pat. Veg. Roma, Ser.3, 8.
- BIRAGHI A., 1954 - Ulteriori notizie sulla resistenza di Castanea sativa Mill. nei confronti di Endothia parasitica (Murr.) And. Boll. Staz. Pat. Veg. Roma, Ser.3, 11, 269-293.
- BRAMBLE W.C., 1936 - Reaction of Chestnut Bark to Invasion by Endothia parasitica. American Journal of Botany, 23, 89-94.
- CAMUS A., 1929 - Les châtaigniers. Monographie des genres Castanea et Castanopsis. Paris.
- CLINTON G.P., 1912 - The Relationships of the Chestnut Blight Fungus. Science, n.s. 36, 907-914.
- DARPOUX H., 1950 - La maladie du châtaignier causée par l'Endothia parasitica. Bull. techn. du châtaignier, 3, 102-112.
- DARPOUX H., RIDE M. et BONDOUX P., 1957 - Le chancre du châtaignier causé par l'Endothia parasitica. Bull. Techn. Inform. Ing. Serv. Agr., 123.
- DARPOUX H., RIDE M. et BONDOUX P., 1957 - Apparition de foyers d'Endothia parasitica (Murr.) And., sur châtaignier en France. C.R. Acad. Agr.
- DAY P.R., 1978 - Epidemiology of hypovirulence. American Chestnut Symposium Proc., West Virginia University, Morgantown, January 4-5, 1978, 118-122.

DAY P.R., DODDS J.A., ELLISTON J.E., JAYNES R.A. and ANAGNOSTAKIS S.L., 1977 - Doubled-stranded RNA in Endothia parasitica. Phytopathology, 67, 1393-1396.

DELBRUCK M., 1949 - Unités biologiques douées de continuité génétique. Colloque international du C.N.R.S. Paris, 7, 33.

DODDS J.A., 1978 - Double-stranded RNA and Virus-like Particles in Endothia parasitica. American Chestnut Symposium Proc., West Virginia University, Morgantown, January 4-5, 1978, 108-110.

ELKINS J.R., WRIGHT J.H. and GRIFFIN G.J., 1977 - Rapid Spectrophotometric Analysis of Tannins Based on their Removal from Solution by Precipitating Agents. Proc. West Acad. Sci., 49, 9.

ELLISTON J.E., 1978 - Pathogenicity and Sporulation of Normal and Diseased Strains of Endothia parasitica in American Chestnut. American Chestnut Symposium Proc., West Virginia University, Morgantown, January 4-5, 1978, 95-100.

ELORRIETA Y ARTAZA J., 1949 - El Castano en Espana. Instituto forestal de investigaciones y experiencias, 48.

FAIRCHILD D., 1913 - The Discovery of the Chestnut Bark Disease in China. Science, XXXVIII, 297-299.

FENAROLI L., 1945 - Il Castagno. Trattati di Agricoltura. Vol. I, Roma

GAUMANN E. und NAEF-ROTH St., 1957 - Über die toxine der Endothia parasitica (Murr.) And. Pflanzenschutzberichte XIX.

GRAVATT G.F., 1935 - Chestnut Blight in California. I. Development of the Disease. Mon. Bull. Calif. Dept. Agr., 24, 173-177.

GRENTE J., 1975 - La lutte biologique contre le chancre du châtaignier par "hypovirulence contagieuse". Ann. Phytopathol., 7, 216-218.

GRENTE J. et BERTHELAY-SAURET S., 1978 - La lutte biologique contre le chancre du châtaignier en France. American Chestnut Symposium Proc., West Virginia University, Morgantown, January 4-5, 1978, 30-34.

GRENTE J., 1979 - Participation au rapport sur le voyage d'études au Japon. Rapport interne du Comité National Interprofessionnel de la Châtaigne et du Marron.

HARTLINE B.K., 1980 - Fighting the Spreading Chestnut Blight. Science, 209, 892-893.

KUHLMANN E.G., 1978 - The Devastation of American Chestnut by Blight. American Chestnut Symposium Proc., West Virginia University, Morgantown, January 4-5, 1978, 1-3.

LAPLACE J.L., 1980 - Contribution à l'étude des toxines d'Endothia parasitica. E.N.I.T.A. DIJON-QUETIGNY, Mémoire de fin d'études, Stage I.N.R.A. Pathologie Végétale CLERMONT-FERRAND.

MCCARROLL D.R. and THOR E., 1978 - The Role of Oxalic Acid in the Pathogenesis of Endothia parasitica. American Chestnut Symposium Proc., West Virginia University, Morgantown, January 4-5, 1978, 60-63.

MACDONALD W.L. and DOUBLE M.L., 1978 - Frequency of Vegetative Compatibility Types of Endothia parasitica in Two Areas of West Virginia. American Chestnut Symposium Proc., West Virginia University, Morgantown, January 4-5, 1978, 103-105.

MERKEL H.W., 1905 - A Deadly Fungus on the American Chestnut. N.Y. Zool. Soc. 10th Ann. Rep., 97-103.

METCALF H. and COLLINS J.F., 1909 - The Present Status of the Chestnut Bark Disease. USDA Bull., 141, 45-54.

METCALF H. and COLLINS J.F., 1911 - The Control of the Chestnut Bark Disease. USDA Farmers' Bull., 467, 24p.

MEYER, 1913 - Cité par DARPOUX H., Bull. Techn. Inform. Ing. Serv. Agr., 1957.

MURRILL W.A., 1906 - A new chestnut disease. Torreyia.

NIENSTAEDT H., 1953 - Tannin as a Factor in the Resistance of Chestnut, *Castanea* sp. to the Chestnut Blight Fungus, Endothia parasitica. Phytopathology 43, 1, 32-38.

M.K. ROANE and R.J. STIPES, 1978 - An Evaluation of the Fungal Genus Endothia. American Chestnut Symposium Proc., West Virginia University, Morgantown, January 4-5, 1978, 70-72.

RIOU F., 1977 - Contribution à l'étude de quelques relations hôte-parasite entre le châtaignier et l'Endothia parasitica (Murr.) And. E.N.I.T.A. de DIJON-QUETIGNY, Mémoire de fin d'études, Stage I.N.R.A. Pathologie Végétale, Clermont-Ferrand.

SACCARDO P.A., 1906 - Notae mycologicae, Series VII, Ann. Mycol. 4, 273-278.

SAMMAN S., SCHELL F.M. and THOR E., 1978 - Effect of Some Compounds of American and Chinese Chestnut Inner Bark on the Growth of Endothia parasitica. American Chestnut Symposium Proc., West Virginia University, Morgantown, January 4-5, 1978, 50-54.

SARDINAS J., 1968 - Rennin Enzyme of Endothia parasitica. Appl. Microbiol., 16, 248-255.

SHEAR C.L. et Al., 1917 - Endothia parasitica and related species. USDA Bull., 380, 82p.

SHOVERS J. and BAVISOTTO V., 1967 - Fermentation Derived Enzyme Substitute from Animal Rennet. J. Dairy Sci., 50, 6.